

**Anpassung an Kältestress in
*Corynebacterium glutamicum***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Nuran Özcan

aus Siegen

Köln, Dezember 2006

Berichtersteller:

Prof. Dr. Reinhard Krämer

Prof. Dr. Ulf -Ingo Flügge

Tag der Disputation: 12. Februar 2007

Adaptation to chill stress in *Corynebacterium glutamicum*

Corynebacterium glutamicum responds to chill stress by synthesis and/or uptake of compatible solutes. Transport is mediated by the secondary uptake systems of the BCCT-carrier BetP and LcoP. The carrier BetP is regulated at the level of activity as well as at the level of transcription and translation. Chill activation of BetP occurs via three different stimuli: chill stress, hyperosmotic stress and the local anaesthetic tetracaine. After maximal activation of BetP by one of these factors no further increase of activity by an additional stimulus was observed. The internal potassium concentration represents the stimulus for osmotic activation whereas chill activation of BetP is detected via a different stimulus. This is underlined by the independence of chill activation of the osmoregulatory C-terminal domain of BetP.

These results led to the question if the transporter BetP itself acts as a chill sensor. Detection of chill stress, in general, may be the consequence of alterations of the physical state of the membrane or the involvement of an additional protein, which possibly acts as a chill sensor. Both models were analysed (i) by heterologous expression of *betP* in *E. coli* as well as (ii) by reconstitution of purified BetP-protein in liposomes with varying lipid composition. BetP did not show any chill activation in these membranes thus no hypothesis could be corroborated.

As an alternative approach the influence of the physical state of the membrane on BetP chill activation was investigated after adaptation of *C. glutamicum* cells to different growth temperatures. Variations of the cultivation temperature led to significant alterations of the fatty acid profiles and the phospholipid headgroup composition. A strong correlation was found between the sensitivity of BetP towards chill stress and the physical state of the membrane depending on growth temperature.

Consequently, BetP itself could act as a chill sensor detecting a temperature shift by varying changes of the protein lipid interactions.

Anpassung an Kältestress in *Corynebacterium glutamicum*

Unter Kältestress oder Osmostress akkumuliert *Corynebacterium glutamicum* kompatible Solute durch Synthese und/oder Aufnahme aus dem umgebenden Medium. Dabei wird die kälteregulierte Aufnahme durch die sekundären Transportsysteme der BCCT-Familie, BetP und LcoP, vermittelt. Der Carrier BetP ist bei Kältestress auf Aktivitätsebene, sowie darüber hinaus auf Transkriptions- und Translationsebene, reguliert. Die Aktivierung von BetP kann durch drei Stimuli erfolgen: Kältestress, hyperosmotische Bedingungen sowie das Lokalanästhetikum Tetracain. Ist das Protein durch einen der Faktoren bereits maximal aktiv, ist eine weitere Stimulierung durch einen zusätzlichen Faktor ausgeschlossen. Während der Transporter unter hyperosmotischen Bedingungen durch eine Erhöhung der internen Kaliumionenkonzentration aktiviert wird, konnte nachgewiesen werden, dass die Kälteaktivierung von BetP durch ein anderes Signal erfolgt, und dass die Reizwahrnehmung dabei unabhängig von der osmosensorischen Domäne des Carriers ist.

Dies führte zu der Frage, ob das Transportsystem BetP als Kältesensor fungiert. Die Detektion von Kältestress könnte grundsätzlich durch BetP selbst über Änderungen des Membranzustandes oder durch Beteiligung eines zweiten Proteins, welches möglicherweise als Kältesensor fungiert, erfolgen. Beide Modelle konnten durch den Verlust der Kälteaktivierung des Carriers nach (i) heterologer Expression von *betP* im *E. coli* System sowie nach (ii) Rekonstitution des gereinigten Proteins in Liposomen variierender Membranzusammensetzung nicht bestätigt werden.

Der Einfluss der Membran als potentieller Stimulus der Kälteaktivierung von BetP wurde nach Kultivierung von *C. glutamicum* Zellen bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Die Zusammensetzung der Fettsäuren sowie der Kopfgruppen der Phospholipide zeigte eine signifikante Korrelation mit der Kultivierungstemperatur. Durch gezielte Variation der Phospholipide der Cytoplasmamembran in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität des Carriers gegenüber Kältestress in hohem Maße von der Phospholipidumgebung abhängt. Dadurch wird die Hypothese, dass BetP selbst als Kältesensor fungiert, der Temperaturunterschiede möglicherweise über eine veränderte Protein-Lipidinteraktion detektiert, untermauert.

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	Bakterienstämme und Plasmide	14
2.2	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	15
2.2.1	Nährmedien für <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i>	15
2.2.2	Medienzusätze.....	16
2.2.3	Kultivierungsbedingungen.....	16
2.3	Molekularbiologische Techniken	16
2.3.1	Herstellung transformationskompetenter Zellen und Transformation	16
2.3.1.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -DH5 α mcr-Zellen sowie <i>C. glutamicum</i> pXMJ19betPC252T	16
2.3.1.2	Transformation von <i>E. coli</i> -DH5 Δ mcr-Zellen	17
2.4	Allgemeine analytische Methoden	18
2.4.1	Proteinbestimmung.....	18
2.4.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	18
2.4.3	Western-Blot-Analyse.....	18
2.4.3.1	Immunologischer Nachweis von BetP- und EctP.....	18
2.4.4	Bestimmung der Osmolalität.....	20
2.5	Biochemische Methoden.....	20
2.5.1	Membranpräparation.....	20
2.5.2	Isolierung von Strep-BetP über StrepTactin [®] -Affinitätschromatographie.....	21
2.5.3	Präparation von Liposomen.....	21
2.5.4	Rekonstitution von Strep-BetP in Liposomen.....	22
2.5.5	Variation der Lipidzusammensetzung der Liposomenmembran.....	22
2.6	Radiochemische Transportmessungen.....	23
2.6.1	Synthese von [¹⁴ C]-Glycinbetain.....	23
2.6.2	Messungen der Glycinbetain-Aufnahme in Proteoliposomen.....	23
2.6.3	Messungen der Glycinbetain-Aufnahme in <i>C. glutamicum</i> Zellen.....	24
2.7	Wachstumsuntersuchungen und Bestimmung interner Solute.....	25
2.7.1	Aufschluss von Zellen durch Permeabilisierung mit CTAB.....	25
2.7.2	HPLC-Analysen.....	26

2.8	Extraktion der Phospholipide in <i>C. glutamicum</i> DHPF pXMJ19betPC252T.....	27
2.8.1	Quantifizierung der Phospholipide durch Phosphatveraschung.....	28
3	ERGEBNISSE.....	29
3.1	Physiologische Untersuchungen zur Kälteanpassung von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032.....	30
3.1.1	Wachstumsverhalten und Bestimmung des internen Solutgehaltes von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 bei Temperaturerniedrigung.....	30
3.1.2	Immunologischer Nachweis von BetP und EctP in <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur.....	33
3.2	Temperaturabhängige Aktivierung von BetP CΔ25 in <i>C. glutamicum</i> DHPF....	35
3.3	Temperaturabhängige Aktivierung von BetP wt in <i>E.coli</i> MKH13.....	40
3.4	Einfluss des Lokalanästhetikums Tetracain auf die Kälteaktivierung von BetP in <i>C. glutamicum</i> DHPF pXMJ19betP C252T.....	42
3.5	Aktivierung der Cystein-freien BetP Variante C252T in Proteoliposomen.....	44
3.5.1	Osmoregulation der BetP Variante C252T in <i>E.coli</i> - Liposomen.....	44
3.5.2	Temperaturabhängige Aktivierungen der Cystein-freien BetP Variante C252T in DOPG fusionierten <i>E.coli</i> -Liposomen.....	46
3.5.3	Untersuchungen zur Osmoregulation und Kälteaktivierung der Cystein-freien BetP Variante C252T in <i>E. coli</i> -Liposomen mit variiertem Anteil an POPG.....	48
3.5.4	Temperaturabhängige Aktivierung von BetP C252T in <i>E. coli</i> -Liposomen mit variiertem Anteil an <i>C. glutamicum</i> Liposomen.....	50
3.6	Bestimmung der temperaturabhängigen Phospholipidzusammensetzung in <i>C. glutamicum</i> DHPFpXMJ19betP C252T.....	52
3.7	Bestimmung der Phospholipidzusammensetzung in <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 nach Adaptation der Zellen an verschiedene Kultivierungstemperaturen.....	55
3.8	Kältereulation von BetP nach Adaptation von <i>C. glutamicum</i> DHPF pXMJ19betP C252T an verschiedene Temperaturen....	57
3.9	Osmoregulation von BetP nach Adaptation von <i>C. glutamicum</i> DHPF pXMJ19betP C252T an verschiedene Kultivierungstemperaturen.....	61

3.10	Kälteaktivierung von BetP in <i>C. glutamicum</i> DHPF pXMJ19 betP C252T nach Kälteadaptation.....	63
3.11	Einfluss der Osmoadaptation auf die Osmoregulation und temperaturabhängige Aktivierung von BetP in <i>C. glutamicum</i> DHPF pXMJ19betP C252T.....	65
3.12	Bestimmung der Phospholipidzusammensetzung nach Osmoadaptation in <i>C. glutamicum</i> DHPF pXMJ19 betP C252T	67
3.13	Bestimmung der internen Solute in <i>C. glutamicum</i> DHPF pXMJ19 betP C252T nach Osmoadaptation sowie nach Variation der Kultivierungstemperatur.....	68
4	DISKUSSION.....	72
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	90
6	LITERATUR.....	91

ABKÜRZUNGEN

AHT	Anhydrotetracyclin
ATCC	American type culture collection
BCCT-Familie	Betain-Cholin-Carnitin-Transporter-Familie
BCIP/NBT	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat / Nitro-Blau-Tetrazolium
BHI-Medium	Brain Heart Infusion-Medium
BSA	Rinderserumalbumin
BTM	Biotrockenmasse
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpm	<i>desintegration per minute</i> (Zerfälle pro Minute)
DOPG	1,2-Dioleoyl-sn-Glycerol-3-Phosphat
DOPI	1,2-Dioleoyl-sn-Glycerol-3-Phosphoinositol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GB	Glycinbetain
HABA	4-Hydroxy-Azobenzon-2-Carboxylsäure
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kDa	Kilo-Dalton
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
KP _i	Kalium-Phosphat-Puffer
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
mosm	mmol/kg bzw. mosmol/kg
OD	Optische Dichte
POPG	1-Palmitoyl-2-Oleyl-sn-Glycerol-3-Phosphat
RT	Raumtemperatur
üN	Übernacht
Upm	Umdrehungen pro Minute

1 Einleitung

Mikroorganismen sind in ihren natürlichen Habitaten einer Vielzahl von Stressfaktoren ausgesetzt. Insbesondere in den oberen Bodenschichten herrscht zum Einen durch die Oligotrophie Nährstofflimitation vor, des Weiteren schaffen physikalische Parameter wie die Temperatur und Wasserverfügbarkeit ständig wechselnde Bedingungen, die zu lebensbedrohlichen Situationen für den Zellmetabolismus führen. Die flexible Anpassung der Bodenmikroorganismen an Temperaturschwankungen und osmotische Stressbedingungen ist somit von entscheidender Bedeutung (Galinski und Trüper, 1994; Wood, 1999; Bremer und Krämer, 2000; Hecker und Völker, 2001).

Die Temperatur beeinflusst verschiedene Bereiche eines Organismus. So sind, neben Transkriptions- und Translationsprozessen, enzymatische und regulatorische Reaktionen sowohl auf Aktivitäts- als auch auf Expressionsebene temperaturabhängig. Neben Änderungen der Enzymkinetiken führt Kältestress ebenfalls zu Änderungen der Membranbeschaffenheit, die Einfluss auf die Transport- und Diffusionseigenschaften sowie die Energetik der Zelle haben. Um die durch Kältestress bedingten negativen Effekte auf den Zellmetabolismus möglichst gering zu halten, verfügen mesophile Mikroorganismen wie *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* und *Bacillus subtilis* über eine Reihe unterschiedlicher Schutzmechanismen (Brigulla *et al.*, 2003; Angelidis und Smith, 2003; Haque und Russell, 2004; Özcan *et al.*, 2005). Adaptationsstrategien bei Kältestress des pathogenen Bakteriums *L. monocytogenes* stehen dabei in besonderem Interesse, da dieser aus Milchprodukten isolierte Organismus in der Lage ist, trotz geringer Temperaturen von ca. -1 °C, in Lebensmitteln zu proliferieren und schwerwiegende Erkrankungen beim Menschen zu verursachen (Mednum und Smith, 2002). Durch die Fähigkeit, sowohl bei Temperaturerniedrigung als auch unter osmotischem Stress zu wachsen, ist *Listeria monocytogenes* tolerant gegenüber zwei bedeutenden Formen der Lebensmittelkonservierung. Das Verständnis der Mechanismen, die an der Kälteadaptation von Mikroorganismen beteiligt sind, ist somit von wissenschaftlicher, medizinischer und wirtschaftlicher Bedeutung.

Der Modellorganismus *C. glutamicum* ist ein apathogenes, Gram-positives, keulen- bzw. stäbchenförmiges (coryneformes) Bakterium, das 1957 isoliert und charakterisiert wurde (Kinoshita *et al.*, 1957). Coryneforme Bakterien sind aerob, unbeweglich und bilden keine Sporen aus. Bei der industriell bedeutenden Produktion von Aminosäuren sind Produktionsstämme von *C. glutamicum* während des gesamten Fermentationsprozesses hohen extrazellulären Osmolalitäten ausgesetzt (Krämer, 1994). Erstaunlicher Weise erfolgt bei einer Reihe von Organismen die Adaptation an unterschiedliche Arten von Stress, wie Osmostress oder Kältestress, durch identische Antworten bzw. physiologische Reaktionen

(Gerhardt *et al.*, 2000; Özcan *et al.*, 2005). Eine weit verbreitete Schutzmöglichkeit, sowohl unter osmotischen Stressbedingungen als auch bei Kältestress, ist die Akkumulation kompatibler Solute (Ko *et al.*, 1994; Deshniem *et al.*, 1997; Rajashekar *et al.*, 1999; Bayles und Wilkinson 2000; Xing und Rajashekar, 2001, Rübenhagen *et al.*, 2001; Özcan *et al.*, 2005). Unter kompatiblen Soluten werden organische, osmotisch wirksame Substanzen zusammengefasst, die bei physiologischen pH-Werten ungeladen oder zwitterionisch vorliegen. Die bis zu molaren cytoplasmatischen Konzentrationen löslichen Solute haben keine störenden Einflüsse auf den Zellmetabolismus und besitzen darüber hinaus eine stabilisierende Wirkung auf die native Konformation von Proteinen. Kompatible Solute rekrutieren sich aus wenigen Stoffklassen wie Zucker, Polyole, freie Aminosäuren, Aminosäurederivate und quartäre Amine (Le Rudulier *et al.*, 1984; Delaunay und Verma, 1993; Miller und Wood, 1996; da Costa *et al.*, 1998; Bremer und Krämer, 2000). Zu den bedeutenden kompatiblen Soluten in *C. glutamicum* zählen Prolin, Glycinbetain, Ectoin und Trehalose (Abb. 1).

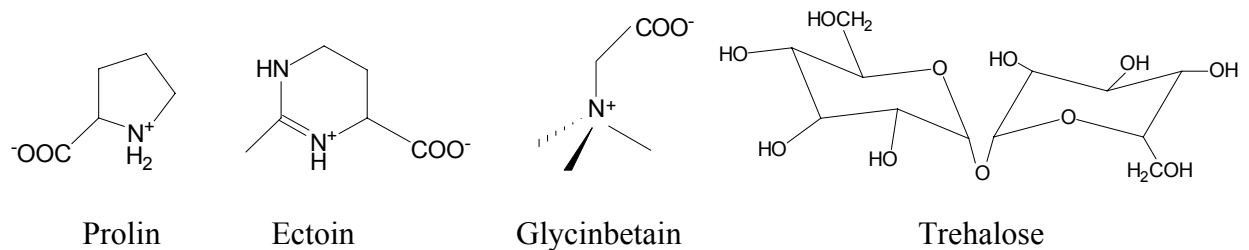


Abb. 1 Strukturformeln einiger weit verbreiteter kompatibler Solute.

Die Wirksamkeit kompatibler Solute bei osmotischem Stress ist auf zwei Effekte zurückzuführen. Zum einen folgt auf die Akkumulation kompatibler Solute die Erhöhung der internen Osmolalität, so dass Wasser zurück in die Zelle fließen kann. Zum Anderen zeichnen sich kompatible Solute durch einen proteinstabilisierenden Effekt aus, der durch das „preferential exclusion model“ beschrieben werden kann (Abb. 2) (Arakawa und

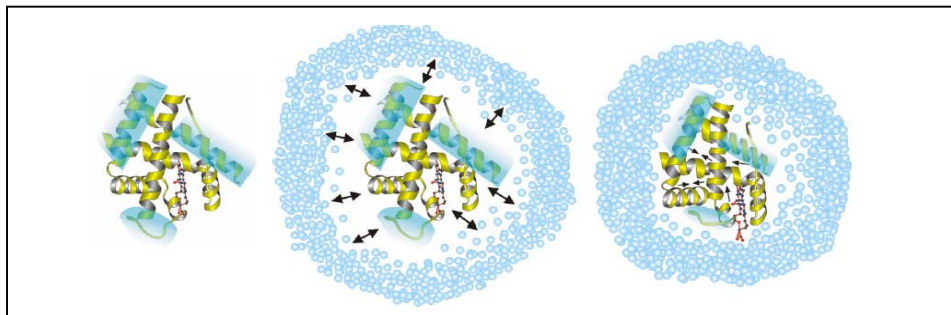


Abb. 2 Modell des präferentiellen Ausschlusses („preferential exclusion“). Dargestellt ist die Stabilisierung der dreidimensionalen Proteinstruktur durch kompatible Solute. Die kompatiblen Solute (blaue Kugeln) sind von der Hydrathülle des Proteins ausgeschlossen, das Protein liegt in kompakter, nativer Konformation vor (Arakawa und Timasheff, 1985).

Timasheff, 1985; Baskakov und Bolen, 1998). Aufgrund energetisch ungünstiger Wechselwirkungen mit dem Peptidrückgrat werden diese Substanzen bevorzugt von der direkten Hydrathülle der Proteinoberfläche ausgeschlossen (Bolen und Baskakov, 2001). Die daraus resultierende Ungleichverteilung der Solute im Cytoplasma stellt eine energetisch ungünstige Situation dar. Der präferentielle Ausschluss ist energetisch am günstigsten, wenn die Oberfläche eines Proteins möglichst klein ist, so dass das Protein in seiner kompakten, nativen Konformation stabilisiert wird (Potts, 1994). Aufgrund energetisch günstigerer Bedingungen sowie einer schnelleren Akkumulationsgeschwindigkeit ist bei externer Verfügbarkeit kompatibler Solute deren Aufnahme gegenüber der Synthese begünstigt (Kemble und McPherson, 1954).

In *Listeria monocytogenes* wurden bereits drei osmoregulierte Transporter charakterisiert, die neben osmotischem Stress auch durch Kälte aktiviert werden (Angelidis *et al.*, 2002; Mednum und Smith, 2002; Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2004). Wird demgegenüber *E. coli* die Möglichkeit entzogen, kompatible Solute durch Transport akkumulieren, so ist dieses Bakterium in der Lage, Trehalose sowohl als osmotische Schutzsubstanz bei hyperosmotischen Bedingungen wie auch als Kryoprotektivum bei Frost zu synthetisieren (Kandror *et al.*, 2002).

Aufnahmesysteme für kompatible Solute in *C. glutamicum*

C. glutamicum ist in der Lage, bei osmotischem Stress extern verfügbare kompatible Solute mit Hilfe von vier Transportsystemen, BetP, EctP, LcoP und ProP, aufzunehmen (Abb. 3). Die Carrier BetP und LcoP zeigen darüber hinaus eine Aktivierung bei Kältestress (Untersuchungen zu einer möglichen Kälteaktivierung von ProP liegen nicht vor). Neben dieser Antwort auf Aktivitätsebene werden, sowohl bei osmotischem Stress als auch bei Kältestress, die Gene der BCCT-Transporter und des Carriers ProP induziert (Peter *et al.*, 1996; Peter *et al.*, 1998(b); Rönsch, 2000; Steger, 2002; Özcan, 2003; Özcan *et al.*, 2005; Möker 2006).

Die sekundären Transporter BetP, EctP und LcoP katalysieren den Symport kompatibler Solute mit Natriumionen, ProP dagegen mit Protonen (Farwick *et al.*, 1995; Peter *et al.*, 1998(b)). Während BetP sehr spezifisch Glycinbetain transportiert, können die übrigen osmoregulierten Transporter EctP, LcoP und ProP mehrere Substanzen aufnehmen und weisen so eine entsprechend geringere Substratspezifität auf. Unterschiedliche Substrataffinitäten und Substratspektren der Transportsysteme gewährleisten dabei eine rasche und flexible Adaptation der Zellen an plötzlich auftretende Stressbedingungen (Tab.1), (Wood, 1999). Neben den Transportsystemen besitzt *C. glutamicum* eine Reihe von Biosynthesewegen für kompatible Solute. Während einige Substanzen wie Glycinbetain lediglich durch Aufnahme in die Zelle akkumuliert werden können, ist *C. glutamicum* in der

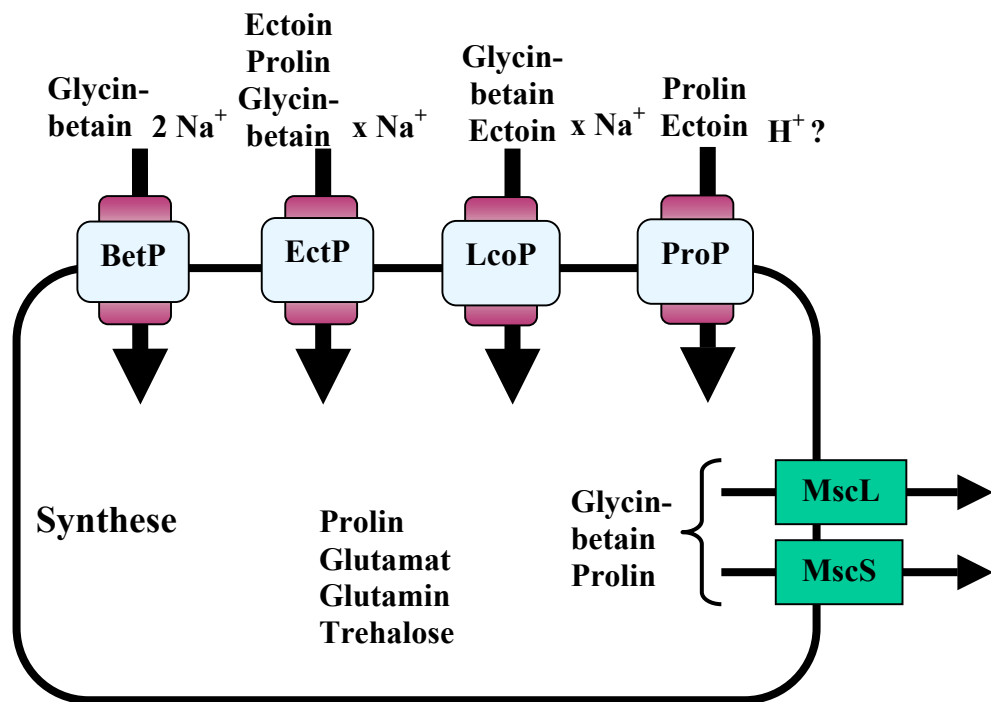


Abb. 3 Osmoregulation von *C. glutamicum*. Gezeigt sind Transportsysteme, die an der Osmoregulation von *C. glutamicum* beteiligt sind. Die Akkumulation von kompatiblen Soluten unter hyperosmotischen Bedingungen erfolgt durch die sekundären Carrier BetP, EctP, LcoP und ProP und/oder durch endogene Synthese. Die Ausschleusung von Ionen und kompatiblen Soluten unter hypoosmotischen Bedingungen erfolgt über mindestens drei mechanosensitive Kanäle (MscL, MscS, Msc ?). Weitere Einzelheiten siehe Text.

Lage, Solute wie Prolin sowohl durch Aufnahme als auch durch Synthese zu akkumulieren. Ausgangssubstanz bei der Prolinbiosynthese in *C. glutamicum* ist Glutamat, welches über drei enzymatische und eine nicht-enzymatische Reaktion in Prolin umgewandelt wird. Es konnte gezeigt werden, dass bei Stickstoffüberschuss Prolin die wichtigste osmoprotektive Substanz in *C. glutamicum* darstellt. Neben der Regulation der Biosynthese-Enzyme auf Aktivitätsebene wurde eine Expressionsregulation der kodierenden Gene *proA*, *proB* und *proC* bei osmotischem Stress in *C. glutamicum* nachgewiesen (Ley, 2001).

Tab.1 Kinetische Parameter und Substratspezifitäten der Aufnahmesysteme für kompatible Solute in *C. glutamicum* (Peter *et al.*, 1996; Peter *et al.*, 1997; Peter *et al.*, 1998(b); Steger, 2002)

Transporter (Familie)	Substrat/ Co-substrat	K _m [μM]	V _{max} [nmol/(min*mg) TG]	Aktivitäts-optimum [osM]
BetP (BCCT)	Betain/Na ⁺	8,6 ± 0,4	110	1,3
EctP (BCCT)	Ectoin/ Na ⁺	63 ± 4,9	27	1,3
	Betain/Na ⁺	333 ± 45	34	
	Prolin/ Na ⁺	1200 ± 180	34	
LcoP (BCCT)	Betain/Na ⁺	154 ± 15	8,5	1,6
	Ectoin/ Na	539 ± 41	8,6	
ProP (MFS)	Prolin/H ⁺	48	71 ⁶	1,3
	Ectoin/H ⁺	132	129 ⁶	

Abkürzungen: BCCT (Betain-Carnitin-Cholin-Transporter), MFS (major facilitator superfamily)

Kältestress

Die Umgebungstemperatur nimmt als abiotischer Faktor eine bedeutende Stellung in der Zellphysiologie von Bakterien ein. Mikroorganismen besitzen bestimmte Temperaturbereiche, bei denen optimale Wachstums- und Teilungsbedingungen gegeben sind. Durch den Jahreszeitenwechsel oder den Tag- und Nachtrhythmus bedingte Abweichungen der Temperaturen erfordern ein großes Anpassungsvermögen der Mikroorganismen, wobei die Toleranzbreite von Temperaturschwankungen je nach Art unterschiedlich ist. Bei einer Temperaturerniedrigung wird in Abhängigkeit vom Gefrierpunkt des Wassers zwischen Frost und Kälte unterschieden. Der Begriff *krýos* (griech. Frost) beschreibt Bedingungen von Biomolekülen in wässrigen Lösungen unterhalb des Gefrierpunktes von Wasser. Liegen allerdings niedrige Temperaturen oberhalb des Gefrierpunktes von Wasser vor, so bezeichnet man den Zustand als Kälte bzw. *psychrós* (griech. Kälte). In Abhängigkeit des Temperaturbereichs, in dem das Wachstumsoptimum eines Bakteriums liegt, werden fünf Klassen unterschieden. Die meisten Bakterien wie *E. coli* und *C. glutamicum* sind mesophil, d.h. sie erreichen ihre maximale Wachstumsrate zwischen 20 °C und 42 °C. Thermophile Organismen wie *Thermus aquaticus* dagegen bevorzugen 42-70 °C, wohingegen extrem thermophile Bakterien wie *Thermotoga* und *Sulfolobus* bei 65-90 °C wachsen. Als hyperthermophil werden Archaeen und Bakterien bezeichnet, die wie *Methanopyrus* bei 85-110 °C zu wachsen vermögen. Am anderen Ende der Temperaturskala des Wachstums stehen Psychrophile wie bestimmte *Bacillus*-Arten und das Eisenbakterium *Gallionella*, die ihre höchsten Wachstumsraten unterhalb von 20 °C erreichen.

Die Geschwindigkeit chemischer Reaktionen, vor allem enzymatisch gesteuerter Reaktionen, ist ebenfalls in hohem Maße temperaturabhängig. Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur wird durch die sogenannte Arrhenius-Gleichung beschrieben, welche im Allgemeinen eine gute Näherung angibt. Die Geschwindigkeitskonstante k ändert sich demnach mit der Temperatur wie folgt:

$$k = A^* e^{-E_a/RT}$$

A = Konstante für jeweilige Reaktion, E_a = Aktivierungsenergie, R = ideale Gaskonstante, T = absolute Temperatur

Der Arrhenius-Gleichung folgend steigt die Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen mit zunehmender Temperatur, so dass die Aktivierungsenergie, die für eine enzymatische Reaktion aufgewendet werden muss, bei Abnahme der Temperatur steigt. Somit wird bei Temperaturniedrigung mehr freie Enthalpie für das Erreichen des energiereichen und instabilen Übergangszustandes benötigt .

Daneben wird eine vereinfachte Betrachtung der Temperaturwirkung auf die Geschwindigkeit einer Reaktion durch die Ermittlung eines Temperaturfaktors ermöglicht, der mit Hilfe des Vergleichs der Geschwindigkeit bei zwei verschiedenen Temperaturen ermöglicht wird. Dabei dient der Temperaturunterschied von 10 °C als Standardbereich, über den die Temperaturabhängigkeit biologischer Funktionen bestimmt wird. Der sogenannte Q_{10} -Wert, ein Maß für die Temperaturabhängigkeit einer chemischen Reaktion, wird mit Hilfe der van't Hoff-Gleichung wie folgt beschrieben:

$$Q_{10} = (k_2 / k_1)^{10/(t_2 - t_1)}$$

k_1, k_2 = Geschwindigkeit der Reaktion (Geschwindigkeitskonstanten) bei den Temperaturen t_1 und t_2

Der Q_{10} -Wert einer bestimmten enzymatischen Reaktion hängt von dem jeweils betrachteten Temperaturbereich ab. In der Regel gelten für chemische Reaktionen, so auch für physiologische Prozesse wie Stoffwechsel und Wachstum, Q_{10} –Werte von 2 – 3, während rein physikalische Prozesse wie die Diffusion mit Q_{10} –Werten von annähernd 1 eine geringere Temperaturabhängigkeit aufweisen.

Anpassungsstrategien bei Kältestress

Um den durch Kältestress bedingten Nachteilen auf die Zellphysiologie entgegenzuwirken, besitzen einige mesophile Mikroorganismen wie *E. coli*, *Listeria monocytogenes* und *Bacillus subtilis* verschiedene Strategien. Enzyme zeichnen sich durch einen sehr geringen Temperatur-Optimumsbereich aus, so dass bereits geringe Änderungen der Temperatur dramatische Einflüsse auf die Zellphysiologie nach sich ziehen. Um dennoch bei Kälte ein moderates Wachstum zeigen zu können, liegen in einigen mesophilen Bakterien Enzyme mit unterschiedlichen Temperaturoptima vor, die in Abhängigkeit von der Temperatur aktiviert werden (Angelidis *et al.*, 2002; Mendum und Smith, 2002, Özcan *et al.*, 2005).

Als Antwort auf eine Temperaturerniedrigung wurde in einigen Organismen wie *B. subtilis* die Induktion spezifischer Proteine, sogenannter Kälteschockproteine, nachgewiesen (Neuhaus *et al.*, 1999; Derzelle *et al.*, 2003). Die bisher noch nicht weitgehend untersuchten Proteine zeichnen sich mit etwa 7 kDa durch ein relativ kleines Molekulargewicht aus werden nach einem Kälteschock verstärkt synthetisiert. Kälteschockproteine sind an einer Reihe von biochemischen Reaktionen beteiligt, die eine Adaptation des Organismus an Kälte oder Frost ermöglichen. Es wird vermutet, dass diese Proteine an mRNA binden und als RNA-Chaperone die Sekundärfaltung der RNA bei Temperaturerniedrigung beeinflussen (Wouters *et al.*, 2000). Kälteschockproteine werden in zwei Gruppen eingeteilt. Während einige Kälteschockproteine, sogenannte „CAPs“ (cold acclimatization proteins) permanent in den Zellen vorliegen, werden „CIPs“ (cold induced proteins) erst bei Kälteeinfluss induziert (Weber und Marahiel, 2003).

Neben enzymatischen Reaktionen ist die Membranbeschaffenheit ebenfalls temperaturabhängig. Wird eine Lipiddoppelschicht unter eine charakteristische Temperatur abgekühlt, erfolgt eine Art Phasenwechsel, der sogenannte Ordnungs-Unordnungs-Übergang. Dabei zeigen die Lipidmoleküle eine höhere Ordnung, die Membran erreicht eine gelartige Struktur, und die Fluidität wird reduziert. Die Übergangstemperatur von Membranen steigt mit zunehmender Kettenlänge und abnehmendem Sättigungsgrad der Fettsäuren. Die C-C-Bindungen der Fettsäureketten liegen in der *cis*-Konformation vor, so dass die Lipiddoppelschicht in einem relativ ungeordneten bzw. flüssigkristallinen Zustand aufweist. Neben anderen bedeutenden Funktionen ist die Fluidität einer Zellmembran entscheidend für Wechselwirkungen eingelagerter Proteine. Bei den meisten Transportproteinen mesophiler Bakterien führen Temperaturerniedrigungen zu einem verlangsamten bzw. eingeschränkten Transport und somit zu lebensbedrohlichen Situationen. Um die Membranfluidität unter Kältestress aufrecht zu erhalten, sind einige Bakterien und poikilotherme Organismen in der Lage, mit Hilfe der Synthese oder des Abbaus von Lipiden die Fettsäurezusammensetzung

ihrer Membranlipide an die Umgebungstemperatur anzupassen (Casadei *et al.*, 2002; Haque und Russell, 2004; Bakholidina *et al.*, 2004; Budde *et al.*, 2006). *Synechocystis sp.* reagiert auf eine Temperaturerniedrigung mit der Induktion von Genen zur verstärkten Expression von Desaturasen. Durch Einführungen von Doppelbindungen in die Fettsäureketten wird die Fluidität der Lipiddoppelschicht erhöht und somit die Interaktionen von Transportproteinen bei Kälte ermöglicht (Inaba *et al.*, 2002; Nicols *et al.*, 2004).

Kältestress in *C. glutamicum*

Die Temperatur des Bodens gemäßiger Breiten liegt die überwiegende Zeit unterhalb optimaler Wachstumstemperaturen mesophiler Bakterien, so dass diese nur sehr langsam oder überhaupt nicht wachsen. Als mesophiler Bodenorganismus mit einer beeindruckenden Toleranz gegenüber Kältestress stellt *C. glutamicum* eine Ausnahme dar. Während *C. glutamicum* bei der optimalen Wachstumstemperatur von 30 °C eine Wachstumsrate von 0,3 h⁻¹ aufweist, wird diese bei Adaptation an 15 °C auf lediglich 0,23 h⁻¹ reduziert. Erst bei gleichzeitiger Osmoadaptation reduziert sich die Wachstumsrate bei 15 °C auf 0,08 h⁻¹ (Özcan, 2003). Auffällig ist, dass *C. glutamicum* auch bei 4 °C in der Lage ist zu wachsen und somit Ähnlichkeit zu *Listeria monocytogenes* aufweist, dessen Wachstum bis zu -1 °C nachweisbar ist (Smith, 1996). Die beeindruckende Toleranz von *C. glutamicum* gegenüber Kältestress wird beim Vergleich mit anderen mesophilen Organismen wie *E. coli* und *B. subtilis* besonders deutlich. Während *E. coli* Temperaturen unterhalb von 7 – 8 °C nicht tolerieren kann, zeigt *B. subtilis* bereits bei Adaptation an 15 °C drastische Einschränkungen im Wachstumsverhalten (Brigulla *et al.*, 2003). Nach dem Überführen von *B. subtilis* in 15 °C temperiertes Medium folgte eine 50-stündige lag-Phase. Im Gegensatz dazu ist *C. glutamicum* bei Adaptation an Kältestress durch ein stetiges Wachstum ohne lag-Phase gekennzeichnet. Dies deutet darauf hin, dass in diesem Organismus keine zeitaufwändigen Anpassungsmechanismen des Zellapparates bei Temperaturerniedrigung erforderlich sind. Demzufolge besitzt *C. glutamicum* einen sehr stabilen Stoffwechsel bzw. ist möglicherweise eine entsprechende Enzymausstattung vorhanden, so dass eine schnelle Anpassung an Temperaturänderungen gewährleistet ist. Es wurde nachgewiesen, dass *B. subtilis* durch die Akkumulation von Glycinbetain und *Virgibacillus pantothenicus* durch Prolin einen Wachstumsvorteil bei Kältestress erfahren. Demgegenüber führte bei Temperaturerniedrigung die externe Verfügbarkeit von Betain oder Prolin zwar zu einer Akkumulation der Solute in *C. glutamicum*, allerdings führte dies zu keiner Steigerung der Wachstumsraten. Da *C. glutamicum* infolge Kältestresses im Vergleich zu osmotischem Stress deutlich geringere Konzentrationen kompatibler Solute akkumuliert, wird vermutet, dass für eine Anpassung an Kältestress lediglich ein niedriger Pool protektiver Substanzen erforderlich ist. Neben der *de novo* Synthese wird die Akkumulation der Solute bei Kältestress

durch Transportproteine vermittelt. Bei den zur Kälteadaptation aktivierten Transportsystemen BetP und LcoP handelt es sich um die gleichen Proteine, die ebenfalls eine Beteiligung an osmotischen Adaptationsprozessen durch die Aufnahme kompatibler Solute aufweisen. Während auf Aktivitätsebene eine Kälteinduzierung der Carrier LcoP und BetP erfolgt, werden alle BCCT-Transporter bei Temperaturenniedrigung auf Expressionsebene verstärkt induziert.

Der kälte- und osmoregulierte Transporter BetP aus *C. glutamicum*

C. glutamicum reagiert sowohl bei Kälte- als auch bei Osmostress mit der Aktivierung des Transporters BetP.

Die meisten lebenden Zellen sind in der Lage, ihren Wasserhaushalt, ihr Zellvolumen und, falls vorhanden, ihren Turgor bei schwankenden extrazellulären Osmolalitäten zu regulieren. Die Fähigkeit zur Osmoregulation erleichtert Wachstum und Überleben von Pro- und Eukaryoten in natürlichen und künstlichen Habitaten. Bei allen Zellen stellt die Cytoplasmamembran eine molekulare Barriere zwischen Intra- und Extrazellularraum dar. Durch die semipermeable Plasmamembran kann Wasser frei diffundieren, wohingegen sie für Makromoleküle und geladene bzw. polare Teilchen eine Barriere darstellt (Bovell *et al.*, 1963). Die Diffusion von Wasser erfolgt dabei stets von Kompartimenten mit hohem zu solchen mit niedrigem Wasserpotential. Zu dieser als Osmoadaptation bezeichneten Anpassung an unterschiedliche osmotische Bedingungen sind neben *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis* und *C. glutamicum* eine Vielzahl weiterer Mikroorganismen befähigt (Berrier *et al.*, 1996; Sukarev *et al.*, 2001; Ruffert *et al.*, 1999; Nottebrock *et al.*, 2003).

Wird eine Bakterienzelle einem hypoosmotischem Schock ausgesetzt, so bedeutet das ein plötzliches Absinken der Osmolalität des externen Mediums. Um dem durch den Wassereinstrom bedingten ansteigenden Zellturgor und der Gefahr zu bersten entgegenzuwirken, reduzieren einige Mikroorganismen wie *E. coli* (Glaasker *et al.*, 1996), *B. subtilis* (Moe *et al.*, 1998) und *Mycobacterium tuberculosis* (Sukarev *et al.*, 2001) das osmotische Potential des Cytoplasmas durch Aktivierung mechanosensitiver Kanäle (Msc), durch die Ionen und osmotisch wirksame Substanzen freigesetzt werden (Schleyer *et al.*, 1993). In *C. glutamicum* wurden zwei Typen mechanosensitiver Kanäle, MscL und MscS, charakterisiert, die der Zelle eine Adaptation an hypoosmotische Bedingungen durch Exkretion von Glycinbetain und Prolin ermöglichen (Abb. 3) (Ruffert *et al.*, 1999; Nottebrock, 2000). Befindet sich ein Bakterium demgegenüber in einem Medium mit hoher Osmolalität und entsprechend geringer Wasseraktivität, so diffundieren Wassermoleküle entlang des osmotischen Gradienten aus dem Cytoplasma der Zelle nach außen. Während dieses als Plasmolyse bezeichneten Vorgangs folgt eine Zunahme der intrazellulären Ionenstärke, die eine Inaktivierung der Enzyme oder sogar eine vollständige Denaturierung durch den Verlust

der Hydrathülle der Proteine zur Folge hat (Abb. 2) (Wood *et al.*, 2001). Mechanismen zur Verhinderung einer weiteren Dehydratation werden in zwei Klassen eingeteilt, die als *salt-in*- und *salt-out*-Anpassungsstrategien bezeichnet werden. Die *salt-in*-Strategie beschreibt einen Prozess meist halophiler Archaeen, die hypersaline Umgebungen bewohnen. Da sie ständig mit hyperosmotischen Bedingungen konfrontiert sind, haben diese Organismen permanent eine hohe interne Kaliumionenkonzentration (Galinski und Trüper, 1994). Durch diese Form der Adaptationsstrategie sind halophile Organismen ausschließlich in der Lage, hyperosmotische Umgebungen zu bewohnen. Daneben herrscht in Habitaten mit ständig wechselnden osmotischen Bedingungen die *salt-out*-Strategie vor, welche keine Adaptation des gesamten Zellapparates an hohe Osmolalitäten voraussetzt und somit einer hohen intrazellulären Salzkonzentration vermeidet. Diese Zwei-Phasen-Strategie, wie sie in *E. coli* und *C. glutamicum* nachgewiesen wurde, beginnt mit der Akkumulation von Kaliumionen im Cytoplasma infolge hyperosmotischer Bedingungen (Dinnbier *et al.*, 1988; McLaggan *et al.*, 1994; Wolf *et al.*, 2003). Da hohe Kaliumkonzentrationen in der Zelle störende Einflüsse auf die Zellphysiologie nach sich ziehen, entlässt die Bakterienzelle diese im Folgenden im Austausch mit kompatiblen Soluten, deren Transport u.a. durch das Transportsystem BetP vermittelt wird.

Bei Kältestress und unter hyperosmotischen Bedingungen nimmt der sekundäre Transporter BetP (Betain Permease) aus *C. glutamicum* Betain im Symport mit zwei Natriumionen auf. Der Transport ist an das elektrochemische Na^+ -Potential gekoppelt. Dabei kann die interne Akkumulation von Betain bis zu einem Gradienten von $4 \cdot 10^6$ (in/ex) erfolgen (Farwick *et al.*, 1995). Als Mitglied der BCCT-Familie hat BetP ein hoch konserviertes Motiv zwischen der achten und neunten Transmembranhelix, für das eine Beteiligung an der Substratbindung angenommen wird (Abb. 4) (Peter *et al.*, 1996; Kappes *et al.*, 1996; Saier *et al.*, 2005). Unter hochosmotischen Bedingungen fungiert BetP gleichzeitig als Osmoregulator und Osmosensor (Rübenhagen *et al.*, 2000). Die Computergestützte Vorhersage der Topologie des Carriers beschreibt BetP als ein Membranprotein mit zwölf Transmembransegmenten, die durch externe bzw. interne Schleifen miteinander verbunden sind. Die im Cytoplasma lokalisierten C- (überwiegend positiv geladen) und N- (überwiegend negativ geladen) terminalen Extensionen haben eine Länge von 55-60 Aminosäuren (Rübenhagen *et al.*, 2001). BetP besteht aus 595 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 64,2 kDa. Die Aktivierung des Transporters bei osmotischem Stress erfolgt im rekonstituierten System durch eine interne Erhöhung der Kaliumionen (oder Cs^+ und Rb^+) (Rübenhagen *et al.*, 2001). Da Natriumionen lediglich sehr geringe und die Kationen Cholin und Ammonium keine Aktivierung auslösten, wirkt BetP nicht als Osmosensor im Allgemeinen, sondern vielmehr als Chemosensor (Rübenhagen *et al.*, 2001, Schiller *et al.*, 2004a). Der Transporter zeigte in Proteoliposomen die gleichen Eigenschaften wie *in vivo*, wodurch nachgewiesen wurde,

dass für die Regulation und Aktivität des Proteins kein zusätzlicher Proteinfaktor benötigt wird. BetP zeichnet sich *in vivo* und *in vitro* durch eine sehr hohe Substrataffinität (Betain K_m : 8,6 μM) und eine äusserst schnelle Aktivierung (< 1 Sekunde) aus. Neben der Acetat- und Glucoseaufnahme ist die BetP-vermittelte Betainaufnahme das schnellste Aufnahmesystem in *C. glutamicum*. Kryoelektronenmikroskopische Untersuchungen zweidimensionaler Kristalle von BetP sowie Gleichgewichts-Ultrazentrifugationen vom solubilisierten Protein lassen darauf schließen, dass BetP sowohl im kristallinen, als auch im solubilisierten Zustand als Trimer vorliegt. Daher wird vermutet, dass die funktionelle Einheit von BetP in der nativen Membrenumgebung ein Trimer ist (Ziegler *et al.*, 2004).

Während die N-Extension vermutlich nicht an der Kaliumsensorik beteiligt ist, führten Deletionen von 25 Aminosäuren der C-terminalen Domäne zu einem Aktivierungsprofil des Carriers, welcher unabhängig von der externen Osmolalität maximal aktiv war. Dies bedeutet, dass diese BetP Mutante durch osmotischen Stress nicht weiter stimulierbar ist und somit die Fähigkeit zur Kaliumsensorik verloren hat. (Peter *et al.*, 1998a; Schiller *et al.*, 2004b). Das Einführen eines Prolins in Position 550 oder 572 der C-Extension bzw. die dadurch bedingte Konformationsänderung führte zu einem Verlust osmoregulatorischer Fähigkeiten (Schiller *et al.*, 2006).

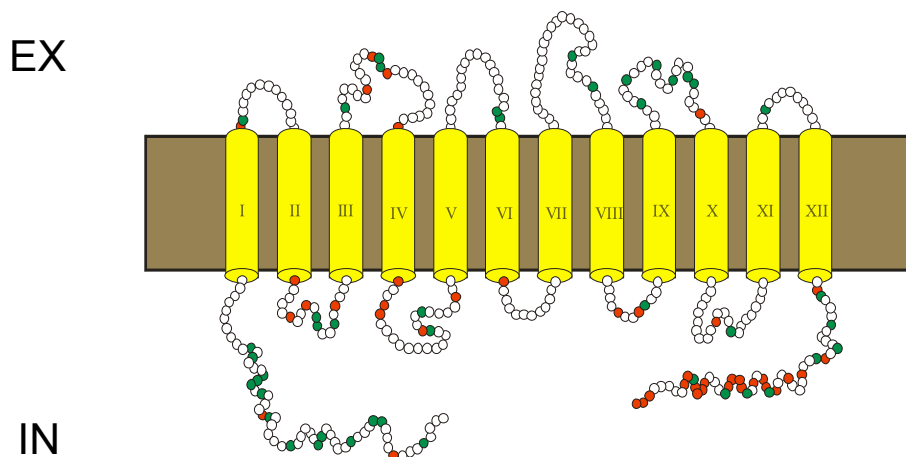


Abb. 4: Topologiemodell von BetP. Die Topologievorhersage wurde mit dem Programm PHDThtm durchgeführt (Rübenhagen, 2001). Die N- und C-terminale Extensionen sind jeweils im Cytoplasma lokalisiert. BetP besitzt 12 Transmembransegmente. Die positiv geladenen Aminosäurereste sind rot, negativ geladene Aminosäurereste sind grün dargestellt.

Neben der Beteiligung an osmotischen Adaptationsprozessen, wird BetP ebenfalls bei Temperaturerniedrigung auf Aktivitätsebene reguliert (Özcan *et al.*, 2005). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auf Expressionsebene das *betP* Gen bei Kältestress induziert

wird. Die Regulation der Transkription von *betP* bei Kältestress wie auch bei osmotischem Stress erfolgt über direkte oder indirekte Weise über das Zwei-Komponenten-System MtrAB (Özcan, 2003, Möker *et al.*, 2004).

Die Kälteaktivierung von BetP spiegelt sich in einem Aktivierungsprofil wieder, welches in Abhängigkeit von der Temperatur und unter niedrigosmotischen Bedingungen, in einer Optimumskurve resultiert. Demgegenüber führt die Temperaturvariation bei gleichzeitiger osmotischer Stimulierung des Carriers zu einer Abhängigkeit der Transportrate nach Arrhenius, d.h. einer Zunahme der Betainaufnahme mit steigender Messtemperatur. Die maximale Aktivität des Proteins BetP bei Kältestimulierung wird bei einer Temperatur von 10 – 15 °C erreicht und entspricht 100 % der maximalen Aktivierung unter hyperosmotischen Bedingungen. Es wurde weiterhin gezeigt, dass die bei Kältestress gemessene Aufnahmegeschwindigkeit die bei dieser Temperatur maximal erreichbare Aktivität darstellt (Özcan *et al.*, 2005). Die interne Kaliumkonzentration ist entscheidend für die Aktivierung des Carriers bei osmotischem Stress, wohingegen bei Temperaturniedrigung keine Akkumulation von Kaliumionen nachgewiesen wurde. Demzufolge wurde ein Einfluss der internen Kaliumkonzentration auf die Wahrnehmung des Kältereizes sowie die Aktivierung von BetP bei Temperaturniedrigung ausgeschlossen. Die unterschiedlichen Effekte, die osmotischer Stress und Kältestress auf die Zellphysiologie von *C. glutamicum* ausüben, führen somit zwar zu einer identischen Antwort in Form der Aktivierung von BetP, die Detektion dieser beiden Stresssituationen erfolgt allerdings durch unterschiedliche Stimuli. Dies bedeutet, dass für die Perzeption von Kältestress ein unterschiedlicher Stimulus verantwortlich ist.

Ziele der Arbeit

Bei Kältestress vermittelt der Transporter BetP aus *Corynebacterium glutamicum* die Aufnahme von Betain. Neben der Aktivitätsebene ist BetP bei Temperaturniedrigung auf Expressionsebene reguliert und steht unter der Kontrolle des Zwei-Komponenten-Systems MtrAB.

BetP gehört zu den am besten untersuchten Aufnahmesystemen für kompatible Solute in Bakterien. Es konnte gezeigt werden, dass der Carrier unter hyperosmotischen Bedingungen zugleich als Osmosensor und Osmoregulator fungiert. Die Wahrnehmung von osmotischem Stress erfolgt durch Messung der internen Kaliumkonzentration unter Beteiligung der C-terminalen Domäne des Proteins. Im Fall der Kälteaktivierung konnte die interne Kaliumkonzentration als Stimulus bereits ausgeschlossen werden.

Im Vordergrund dieser Arbeit stand die Identifizierung des Stimulus der Kälteaktivierung und somit die Fragestellung, ob (i) BetP als Kältesensor fungiert, sowie (ii) welche Funktion die osmoregulatorische Domäne bei der Detektion von Kältestress ausübt. Dazu sollte eine Kalium-insensitive BetP Mutante bezüglich ihrer kälteregulatorischen Eigenschaften untersucht werden. Als mögliche Faktoren, die an der Kältestimulierung beteiligt sein könnten, kamen Modifizierungen des Transporters oder die Interaktion eines weiteren Proteins, welches als Kältesensor fungiert, in Frage. Durch den Einsatz des Proteoliposomensystems sollten *in vitro* Untersuchungen dazu dienen, mögliche kältesensorische Eigenschaften von BetP nachzuweisen. Darüber hinaus sollten *in vivo* Aktivitätsstudien nach homologer und heterologer Expression des *betP* Gens weitere Hinweise über den Mechanismus der Kälteaktivierung des Transporters geben.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollte durch physiologische Experimente die Bedeutung des Carriers sowie interner kompatibler Solute bei der Kälteadaptation von *C. glutamicum* charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

Alle im Text erwähnten Chemikalien und Reagenzien wurden, sofern nicht näher bezeichnet, von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech Inc. (Freiburg), Avanti (Alabaster, USA) 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 2 und die verwendeten Plasmide in Tabelle 3 aufgeführt.

Tab.2 Eigenschaften der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp, Charakteristika	Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5amcr	<i>endA1 supE44 thi-1λ recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF) U196 Φ80dlacZ ΔM15mcrA Δ(mrr hsdRMS mcrBC)</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
MKH13	<i>araD39 (argF-lac) U169 relA51 rps150 flbB5301 deoC ptsF25 Δ(putPA)101 Δ(proP)2 Δ(proU)</i>	Haardt <i>et al.</i> , 1995
<i>C. glutamicum</i>		
ATCC 13032	Wildtyp	Abe <i>et al.</i> , 1967
DHPF	ATCC 13032 (<i>ΔbetP</i> , <i>ΔectP</i> , <i>ΔlcoP</i> , <i>ΔproP</i> , <i>ΔputP</i>)	Steger, 2001
Cgl <i>ΔotsA</i> , <i>ΔtreS</i> , <i>ΔtreY</i>	ATCC 13032 (<i>ΔotsA</i> , <i>ΔtreS</i> , <i>ΔtreY</i>)	Wolf <i>et al.</i> , 2003

Tab.3 Eigenschaften der verwendeten Plasmide

Plasmid	Genotyp, Charakteristika	Referenz
pASK-IBA5 <i>betP</i>	pASK-IBA5 mit <i>betP</i> in der Bsal/HindIII Schnittstelle; 5' Fusion mit DNA Sequenz des StrepTagII	Rübenhagen <i>et al.</i> , 2000
pXMJ19 <i>betP</i> C252T	pXMJ19 mit <i>betP</i> C252T	Schiller, 2004
pEKEX2 <i>betPC</i> Δ25	25 C-terminale Aminosäuren deletiert	Peter <i>et al.</i> , 1998

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) (Sambrock *et al.*, 1989) verwendet. Zur Herstellung von Festmedium wurden vor dem Autoklavieren 16 g/l Bacto Agar zugesetzt. 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.

C. glutamicum wurde zur Kultivierung vor Durchführung biochemischer Versuche 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.

Die verwendeten Nährmedien waren wie folgt zusammengesetzt:

MMI-Minimalmedium (0,3 osm/kg), (modifiziert nach Kase und Nakayama, 1972):

5 g (NH₄)₂SO₄

5 g Harnstoff

2 g KH₂PO₄

2 g K₂HPO₄ pH (NaOH) = 7,0, ad 916 ml mit H₂O.

Nach dem Autoklavieren wurden folgende Lösungen (steril) zugegeben:

80 ml 50 %ige (w/v) Glucoselösung

1 ml 1 %ige (w/v) CaCl₂-Lösung

1 ml 1 M MgSO₄-Lösung

1 ml 0,02 %ige Biotin-Lösung

1 ml Spurensalze (1 g FeSO₄ x 7H₂O; 1 g MnSO₄ x H₂O; 0,1 g ZnSO₄ x 7H₂O;
0,021 g CuSO₄ x 5H₂O; 2 mg NiCl₂ x 6H₂O; ad 100 ml H₂O)

Sollte der Einfluss kompatibler Solute auf das Wachstum untersucht werden, wurde das MMI-Minimalmedium durch Zusatz von 10 mM Glycinbetain, 10 mM Prolin oder 750 mM NaCl angereichert.

2.2.2 Medienzusätze

Die Selektion rekombinanter Stämme erfolgte durch die Zugabe von sterilfiltriertem Kanamycin (50 µg/ml), Carbenicillin (50 µg/ml) bzw. Chloramphenicol (20 µg/ml) zu den jeweiligen autoklavierten Medien. Die Expression von *betP* unter Kontrolle des Tetrazyklinpromotors erfolgte durch Zugabe von 200 µg/l Anhydrotetrazyklin (AHT) zum Medium. Zur Expression von Genen, die unter der Kontrolle IPTG-induzierbarer Promotoren vorlagen, wurden dem Medium, wenn nicht anders angegeben, 250 µM IPTG zugesetzt.

2.2.3 Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung von *E. coli*-Zellen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, aerob bei 37°C in Schüttelkolben mit Schikane (125 rpm) unter Verwendung der durch die Resistenzmarker benötigten Antibiotika. Die *C. glutamicum*-Kulturen wurden bei 30 °C aerob in Schikanekolben inkubiert. Die Zelldichte der Bakterienkulturen wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt (Spektrophotometer Novaspecll, Pharmacia Biotech Inc.). Eine Bakterienkultur mit einer OD₆₀₀ von 1 entspricht dabei 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 (80 % Endkonzentration) versetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C und bei -80 °C.

2.3 Molekularbiologische Techniken

2.3.1 Herstellung transformationskompetenter Zellen und Transformation

2.3.1.1 Herstellung kompetenter *E.coli*-DH5 α mcr-Zellen sowie *C. glutamicum* pXMJ19betPC252T

Transformationskompetente *E. coli*- DH5 α mcr Zellen wurden nach der Methode von Inoue *et al.* (1990) hergestellt und transformiert. Dafür wurden die Zellen in 20 ml LB-Flüssigmedium bei 37°C und 110 rpm für ca. 8 Stunden kultiviert. Aus dieser Vorkultur wurde abends 1 ml entnommen und in 250 ml SOB-Medium überführt. Diese Kultur wurde über Nacht bei RT und 200 Upm geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von circa 0,6 erreicht wurde. Die Zellen wurden

zentrifugiert (2000 g, 10 min, 4°C), in 4°C kaltem TB-Puffer gewaschen und in 20 ml TB-Puffer (4°C) resuspendiert. 1,4 ml DMSO wurden portionsweise hinzugegeben, bevor die nun kompetenten Zellen in Aliquots abgefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert wurden.

TB-Puffer

10 mM Pipes

250 mM KCl

15 mM CaCl₂ ad 170 ml H₂O, (pH 6,7 mit KOH)

Anschließende Zugabe von 55 mM MnCl₂, ad 200 ml H₂O.

SOB-Medium

5 g Trypton

1,25 g Hefeextrakt

0,125 g NaCl

625 µl 1 M KCl ad 249 ml H₂O

Nach Autoklavieren Zugabe von 1,25 ml steriler 2 M MnCl₂-Lösung.

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 µF) mit einem Bio-Rad-Gene-Pulser (Bio-Rad, München) mit Plasmiden (1 µg Plasmid DNA pro Transformation) transformiert.

2.3.1.2 Transformation von *E. coli*-DH5Δmcr-Zellen

Zur Transformation wurden 100 µl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, 1 µl des Plasmids hinzugegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend erhielten die Zellen für 30 sec einen Hitzeschock (42°C), bevor sie wieder auf Eis gestellt wurden. Zu dem Ansatz wurden 800 µl SOC-Medium (SOB-Medium, 0,36% Glukose) hinzugegeben und die Zellen für 1 h bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden zentrifugiert, in 100 µl des Überstandes resuspendiert, auf LB-Agar-Platten (50 µg/ml Carbenicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.4 Allgemeine analytische Methoden

2.4.1 Proteinbestimmungen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde die Amido-Schwarz-Methode nach Schaffner und Weissmann (Schaffner und Weissmann, 1973) angewandt, da bei dieser Methode die im Ansatz enthaltenen Lipide die Konzentrationsbestimmung nicht beeinflussen. Zur Erstellung der Eichreihen wurde BSA eingesetzt.

2.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bakterielle Proteine aus *C. glutamicum* wurden nach Membranpräparation in 12,5%-igen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970) elektrophoretisch getrennt. Die Proteine wurden vor dem Auftrag auf das Gel mit 4-fach konzentriertem Probenpuffer (20% Glycerin, 8% SDS, 400 mM Tris/Cl (pH 6,8), 10 mM EDTA, 100 μ M β -Mercaptoethanol, Bromphenolblau) versetzt. Der direkte Nachweis der Proteine in den Gelen erfolgte, je nach aufgetragener Proteinmenge, mittels Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987) oder Coomassie Brillant Blau Färbung (Sambrook *et al.*, 1989).

2.4.3 Western-Blot-Analyse

2.4.3.1 Immunologischer Nachweis von BetP- und EctP

Zum immunologischen Nachweis der Proteine mit BetP und EctP spezifischen Antikörpern wurde die Methode von Towbin *et al.* (Towbin *et al.*, 1979) verwendet. Die Übertragung der Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran wurde mit dem *semi-dry*-Blotverfahren (Kyhse-Andersen, 1984) durchgeführt. Dazu wurde die Membran kurz in 60%-igem Methanol inkubiert und in Transferpuffer äquilibriert. Die Membran wurde anschließend auf einen Stapel aus fünf in Gelgröße zurechtgeschnittenen und in Transferpuffer getränkten Filter-Papieren (Schleicher & Schuell, Dassel) in eine "semi-dry-Blot"-Apparatur gelegt. Auf die Membran wurde dann sofort luftblasenfrei das Proteingel gegeben. Zum Schluss wurde auf das Gel noch ein weiterer Stapel aus fünf in Transferpuffer getränkten Filter-Papieren gelegt und der Proteintransfer auf die Membran bei 0,8 mA pro cm² Oberfläche für eine Stunde durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran zunächst für eine Stunde in Blockierungspuffer bei Raumtemperatur geschüttelt und dann für eine weitere Stunde in dem

gleichen Puffer mit dem ersten Antikörper in einer Verdünnung von 1:10.000 inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer für je 20 Minuten wurde die Membran für eine Stunde mit dem zweiten Antikörper in einer Verdünnung von 1:20.000 in Blockierungspuffer bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Detektion der Signale erfolgte über Präzipitation eines Farbstoffs auf der Membran. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer für je 20 Minuten wurden 66 µl NBT-Stammlösung (NBT-Pulver, Roth, Karlsruhe) und 33 µl BCIP-Stammlösung (BCIP-Pulver, Roth, Karlsruhe) in 10 ml Inkubationspuffer verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Membran wurde bis zur gewünschten Signalstärke im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ abgestoppt. Zuletzt wurde die Membran auf Filter-Papieren (Schleicher & Schuell, Dassel) getrocknet.

Transferpuffer:

10 mM CAPS, 1,5 M NaCl, 10% Methanol, pH (NaOH) = 11

Waschpuffer:

50 mM Tris, 0,15 M NaCl, pH (HCl) = 7,5

Blockierungspuffer:

1X Waschpuffer mit 5% Milchpulver

NBT-Stammlösung:

0,5 g p-Nitrotetrazoliumblausäurechlorid (NBT) wurden in 10 ml 70% Dimethylformamid gelöst, in 500 µl Portionen aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

BCIP-Stammlösung:

0,5 g 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz (BCIP) wurden in 10 ml 100% Dimethylformamid gelöst, in 500 µl Portionen aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

Inkubationspuffer:

100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 100 mM Tris, pH (NaOH) = 9,5

2.4.4 Bestimmung der Osmolalität

Die Bestimmung der Osmolalität eines Puffers oder Mediums wurde durch Gefrierpunktniedrigung mit dem Osmometer Osmomat 030 (Gonotec, Berlin) nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Standard wurden 150 mM NaCl (300 mosmol/kg) eingesetzt.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Membranpräparation

Für die Präparation von Plasmamembranen aus *betP*-exprimierenden *E. coli* DH5amcrp*betPC252T* Zellen wurde LB-Medium (50 µg/ml Carbenicillin) mit einer ÜN-Kultur 1:30 angeimpft und bei 30°C und 135 Upm geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 1 wurde die Kultur mit 200 µg/l AHT (IBA, Göttingen) induziert und mindestens drei weitere Stunden geschüttelt. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden zentrifugiert und mit 100 mM KP_i-Puffer (pH 7,5) gewaschen. Anschließend wurden diese in 100 KP_i pH 7,5, mit DNase (1:500) und Complete® nach Herstellerangaben resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit einer French Press (3 Durchgänge; SLM Aminco®, Rochester, USA) bei einem Druck von 1,100 psi. Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurden die Membranen bei 300.000 g für 50 Minuten sedimentiert, mit dem oben aufgeführten Puffer gewaschen, anschließend in 1-2 ml Puffer pro Liter Zellkultur resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Für die Präparation von Plasmamembranen aus *betP*-exprimierenden *C. glutamicum* Zellen wurde zunächst eine Kultur in BHI-Medium angezogen. Ein Aliquot der Zellen wurde anschließend auf eine OD₆₀₀ 1 in BHI-Medium (250 µM IPTG) überimpft und bei der entsprechenden Temperatur bzw. Osmolalität bis zur spätexponentiellen Phase (OD₆₀₀ von 8) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und die Membranen analog zu *E. coli* Zellen isoliert.

2.5.2 Isolierung von Strep-BetP über StrepTactin®-Affinitätschromatographie

Zur Isolierung von BetP wurde das *Strep-tag*®II–Peptid (NH₂-WSHPQFEK-COOH; IBA, Göttingen; Schmidt *et al.*, 1996) an den N-Terminus des Proteins fusioniert. Der *Strep-tag*®II bindet mit hoher Spezifität an StrepTactin® (Voss & Skerra, 1997) und kann mit Desthiobiotin eluiert werden. Die im Folgenden beschriebenen Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Zur Solubilisierung der präparierten Membranen wurden die Membransuspensionen zweifach verdünnt, so dass eine Endkonzentration von 50 mM KP_i (pH 8,0), 8,6% Glycerin, 1 mM EDTA erreicht wurde. Anschließend wurde das Detergenz Dodecylmaltosid unter Rühren tropfenweise bis zu einer Endkonzentration von 2% (v/v) hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde für mindestens 30 min bei 4°C unter Rühren inkubiert, bevor das Solubilisat bei 86900g für 20 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde mit 50 mM KP_i-Puffer (pH 8,0), 200 mM NaCl, 8,6% Glycerin, 1 mM EDTA vier- bis fünffach verdünnt, um die Detergenzkonzentration herabzusetzen. Das Säulenmaterial (mit StrepTactin® beladene Sepharose; IBA, Göttingen) wurde mit 50 mM KP_i-Puffer (pH 8,0), 200 mM NaCl, 8,6% Glycerin, 1 mM EDTA, 0,1% Dodecylmaltosid äquilibriert. Das verdünnte Solubilisat wurde auf die Säule aufgetragen, wobei die Durchflussrate auf 2-3 Tropfen/min eingestellt wurde. Anschließend wurde die Säule mit 10 Säulenvolumen 50 mM KP_i-Puffer (pH 8,0), 500 mM NaCl, 8,6% Glycerin, 1 mM EDTA und danach mit 3 Säulenvolumen 50 mM KP_i-Puffer (pH 8,0), 200 mM NaCl, 8,6% Glycerin, 1 mM EDTA gewaschen. BetP wurde mit 50 mM KP_i-Puffer (pH 8,0), 200 mM NaCl, 8,6% Glycerin, 1 mM EDTA, 5 mM Desthiobiotin bei einer Durchflussrate von 3 Tropfen/min eluiert. Zur Regeneration der Strep-Tactin-Bindestellen wurde das Desthiobiotin mit 10 Säulenvolumen 50 mM KP_i-Puffer (pH 8,0), 200 mM NaCl, 8,6% Glycerin, 1 mM EDTA, 1 mM HABA verdrängt und anschließend das StrepTactin®-Material zur Wiederverwendung mit mind. 10 Säulenvolumen 50 mM KP_i-Puffer (pH 8,0), 200 mM NaCl, 8,6% Glycerin, 1 mM EDTA gewaschen.

2.5.3 Präparation von Liposomen

Zur Herstellung von Liposomen wurden *E. coli polar lipid extract* (Avanti Polar Lipids, Inc., USA), oder die synthetischen Phospholipide 1,2-Dioleoyl-sn-Glycerol-3-Phosphat (DOPG), 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycerol-3-Phosphat (POPG), TetraOleoyl-Cardiolipin (TODPG), 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycerol-3-Phosphat (DPPG) verwendet. Alle Lipide waren in Chloroform suspendiert. Das Lösungsmittel wurde am Vakuumrotationsverdampfer abgezogen. Anschließend wurden die Lipide bis zur Trocknen über Nacht lyophilisiert. Die Lipide wurden

in 100 mM KP_i pH 7,5, 2 mM β -Mercaptoethanol unter starkem Rühren resuspendiert (20 mg Lipid/ml), aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.5.4 Rekonstitution von Strep-BetP in Liposomen

Der Einbau von Strep-BetP in Liposomen erfolgte nach der Methode von Rigaud *et al.* (1995). Zur Rekonstitution des Proteins in Liposomen wurden diese in 100 mM KP_i pH 7,5 auf eine Konzentration von 5 mg/ml verdünnt. Um eine einheitliche Grösse zu erhalten und die multilamellare Struktur zu zerstören, wurden die Lipide 14 mal durch Polycarbonatfilter extrudiert (Porengröße: 400 nm). Die extrudierten Liposomen wurden durch Zugabe von Triton X-100 bis kurz über den Punkt der Detergenzsättigung titriert. Verfolgt wurde die Insertion des Detergenz in die Liposomen durch Trübungsmessung bei 540 nm. Anschließend wurde gereinigtes BetP im Lipid-Protein-Verhältnis (LPR) von 30:1 (w/w) zugegeben und die Suspension unter leichtem Schütteln für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Abreichern des Detergenz wurde der Ansatz mit x mg (Nassgewicht; BioRad, München; $x = \text{eingesetzte } \mu\text{l Triton X-100} * 5 + \text{eingesetzte } \mu\text{g Dodecylmaltosid} * 10$) Biobeads zweimal für je 1 h bei RT, einmal mit der doppelten Menge Biobeads über Nacht bei 4°C und anschließend wieder mit der einfachen Biobeadmenge für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach Abtrennung der Biobeads wurden die Proteoliposomen zentrifugiert (353000 g, 20 min, 15°C), zweimal mit 100 mM KP_i pH 7,5 gewaschen, im gleichen Puffer resuspendiert (ca. 60 mg Lipid/ml), in flüssigem Stickstoff schockgefroren, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.5.5 Variation der Lipidzusammensetzung der Liposomenmembran

Zur Variation der Lipidzusammensetzung durch Liposomenfusion wurden Proteoliposomen aus *E. coli* Phospholipiden mit Liposomen aus synthetischen Phospholipiden in den angegebenen Verhältnissen gemischt, extrudiert (400 nm Membran) und für ca. 1 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei RT langsam aufgetaut (ca. 45 Minuten). Die so präparierten Proteoliposomen konnten nach Extrusion zur Transportmessung eingesetzt werden.

2.6 Radiochemische Transportmessungen

2.6.1 Synthese von [¹⁴C]-Glycinbetain

Die Synthese von [¹⁴C]-Glycinbetain erfolgte nach der Methode von Landfald und Strøm (1986). Die Reaktion wurde in einem Volumen von 500 µl über Nacht bei 37°C durchgeführt und durch Zugabe von 80 µl 0,7 M Perchlorsäure abgestoppt. Der Reaktionsansatz enthielt 250 µl [¹⁴C]-Cholin/Cl-Lösung (1,85 MBq; spez. Aktivität: 2,0 GBq/mmol; Amersham, Braunschweig) und 250 µl 100 mM NaP_i (pH 8,0), zu dem 30 Units Cholinoxidase aus *Alcaligenes sp.* (Sigma, Steinheim) gegeben wurden. Die Reinigung des synthetisierten [¹⁴C]-Glycinbetains erfolgte mittels Ionenaustauschchromatographie. Die Kationenaustauscher-Säulen (Dowex 50W) wurden durch Waschen mit 1 M HCl in die protonierte Form gebracht. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf die Säulen gegeben und das [¹⁴C]-Glycinbetain mit 2 M NH₄OH eluiert. Das Eluat wurde im Vakuum getrocknet und in 2 ml H₂O aufgenommen. Die Reinheit des [¹⁴C]-Glycinbetains wurde mittels Dünnschichtchromatographie (Laufmittel: Methanol/Wasser: 50/50; Kieselgel TLC Platten, Merk) nach der Methode von Blunden *et al.* (1981) kontrolliert. Nach sechsständiger Laufzeit erfolgte die Auswertung des Chromatogramms mit einem „Phosphoimager“.

2.6.2 Messungen der Glycinbetain-Aufnahme in Proteoliposomen

Ein Aliquot Proteoliposomen wurde, wenn nicht anders angegeben, mit 100 mM KP_i pH 7,5 auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt, dreizehnmal extrudiert, mit dem gleichen Puffer auf ein Volumen von 3 ml aufgefüllt und zentrifugiert (353000 g, 20 min, 20 °C). Die Proteoliposomen wurden in einem geringen Volumen resuspendiert und zur Transportmessung eingesetzt. Zur Messung der Transportaktivität von BetP, wurde, wenn nicht anders angegeben, ein externer Puffer mit 50 mM NaP_i pH 7,5 verwendet. Die gewünschte Osmolalität wurde jeweils durch Zugabe von Sorbitol oder Prolin zum externen Puffer eingestellt. Zur Transportmessung wurden 500 µl externem, temperiertem Puffer 15 µM ¹⁴C-Glycinbetain und 1 µM Valinomycin zugesetzt. Zum Starten der Reaktion wurden 2,5 µl Proteoliposomen hinzugefügt. Jeweils 200 µl des Ansatzes wurden nach 5 und 10 sec abgenommen und auf einen Zellulose-Mischester-Filter (0,22 µm Porengröße; Millex, Eschborn) gegeben und mit Hilfe einer Mehrfachfiltrationsanlage (Hoefer, Pharmacia Biotech) gefiltert. Der Filter, auf dem die Proteoliposomen adsorbiert waren, wurde

unmittelbar nach Zugabe des Reaktionsansatzes mit 2,5 ml 100 mM LiCl gewaschen und mit 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint ecoplus, Roth, Karlsruhe) inkubiert. Die Radioaktivität wurde in einem β -Strahlen-Zählgerät (Beckman, München) bestimmt. Zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität des Reaktionsansatzes wurden 100 μ l direkt mit Szintillationsflüssigkeit inkubiert und dessen Radioaktivität bestimmt. Alle im Ergebnisteil angegebenen Transportraten sind, wenn nicht anders angegeben, Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

2.6.3 Messungen der Glycinbetain-Aufnahme in *C. glutamicum* Zellen

Die *C. glutamicum* Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, über Nacht in BHI-Medium mit 150 μ M IPTG und 20 μ g/ml Chloramphenicol bzw. 50 μ g/ml Kanamycin bei 30°C (120-130 rpm) bis zur spätexponentiellen Phase (OD_{600} von ca.8) angezogen, zentrifugiert und zweimal mit 4°C temperiertem 50 mM KP_i -Puffer, 50 mM NaCl, pH 7,5 gewaschen und resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen im gleichen Puffer auf eine OD_{600} von 2-4 verdünnt. Die Erhöhung der Osmolalitäten wurde durch Zugabe von NaCl oder KCl erreicht. Die Energetisierung der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 10 mM Glukose. Bis zu den Messungen wurden die Zellen auf Eis gelagert. Vor Beginn der Aufnahmemessungen wurden die Zellen 3 min bei verschiedenen Temperaturen von 5 °C – 30 °C unter hochosmolaren (50 mM KP_i -Puffer pH 7,5; 600 mM NaCl) sowie unter niedrigosmolaren (50 mM KP_i -Puffer, pH 7,5; 50 mM NaCl) Bedingungen inkubiert. Der Start der Messungen erfolgte durch die Zugabe von [14 C]-markiertem Substrat. Über einen Zeitraum von 0,25-2,5 Minuten wurden in regelmäßigen Abständen 5-6 Proben von je 200 μ l entnommen und mit Hilfe einer Mehrfachfiltrationsanlage auf Glasfaserfilter (Typ F, Millipore, Eschborn) abfiltriert, wobei die Filter unmittelbar nach der Filtration mit 5 ml Waschlösung (0,1 M LiCl) gewaschen wurden. Die Filter wurden mit 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und mittels eines Szintillationszählers (LS 6500, Beckmann Coulter Inc., Unterschleissheim-Lohhof) ausgewertet. Durch die lineare Auftragung der Zeit gegen die gemessene Radioaktivität kann mit Hilfe der erhaltenen Steigung die Transportgeschwindigkeit berechnet werden.

Die Anzuchtbedingungen der Zellen, die vor der Aufnahmemessung an unterschiedliche Osmolalitäten oder Temperaturen adaptiert wurden, waren wie folgt: Der Stamm *C. glutamicum* DHPF pXMJ19BetP C252T wurde zunächst in BHI-Medium angezogen. Ein Aliquot der Zellen wurde anschließend auf eine OD_{600} 1 in BHI-Medium überimpft und bei

der entsprechenden Temperatur bzw. Osmolalität bis zur spätexponentiellen Phase (OD_{600} von 8) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, in Puffer (50 mM KP_i -Puffer, pH 7,5; 50 mM NaCl) gewaschen, mit Glukose energetisiert und bis zu den Betain-Aufnahmemessungen auf Eis gelagert.

2.7 Wachstumsuntersuchungen und Bestimmung interner Solute

Der Stamm *C. glutamicum* DHPF pXMJ19BetP C252T wurde zunächst in BHI-Medium angezogen. Ein Aliquot der Zellen wurde anschließend auf eine OD_{600} 1 in BHI-Medium überimpft und bei der entsprechenden Temperatur bzw. Osmolalität bis zur spätexponentiellen Phase (OD_{600} von 8) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, in Puffer (50 mM KP_i -Puffer, pH 7,5; 50 mM NaCl) gewaschen und die Zellpellets bei -20 °C eingefroren.

C. glutamicum ATCC13032 wurde zunächst bei 30 °C in BHI-Medium, dann in MMI-Mimimalmedium angezogen und nochmals auf MMI-Medium überimpft. Nach Erreichen einer OD_{600} von 4 wurden die Zellen zentrifugiert und in frischem, temperiertem MMI-Medium bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 2 bzw. 4 ml Proben entnommen, 1 min bei 15.000 rpm zentrifugiert und zweimal mit 0,4 M Sorbitol gewaschen. Die Zellpellets wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

2.7.1 Aufschluss von Zellen durch Permeabilisierung mit CTAB

Die Verwendung von CTAB (Cetyltrimethyl-ammoniumbromid) für den Aufschluss von Zellen durch Permeabilisierung stellt eine einfache und schnelle Aufschlussmethode dar. Für den Nachweis von Betain und Prolin wurden die Zellpellets in 1 ml 0,1% CTAB resuspendiert und ca. 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach anschließender Zentrifugation (15.300 rpm, 2 Minuten) wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bis zur Weiterverwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.7.2 HPLC-Analysen

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high pressure liquid chromatography*) ist eine schnelle und effektive Methode der Flüssigkeitschromatographie. Sie erlaubt eine hochauflösende Trennung über einen weiten Bereich verschiedener Substanzklassen innerhalb kurzer Zeit. Bei der *reversed phase* HPLC ist das Säulenmaterial (stationäre Phase) unpolarer als das verwendete Laufmittel (mobile Phase). Unpolare Substanzen werden somit aufgrund stärkerer Wechselwirkungen mit der stationären Phase mit längeren Retentionszeiten eluiert als polare.

Die Analyse von Glycinbetain wurde mit einer HPLC-Anlage der Firma Thermo Separation Produkts verwendet. Als Vorsäule wurde LiChroCART 4-4, LiChrospher 100 Amino, Partikelgröße 5 µm, Fa. Merck, Darmstadt verwendet. Als Trennsäule wurde Grom-Sil 100 Amino 1-PR, 125-4 mm, Partikelgröße 3 µm, (Fa. Grom, Herrenberg) eingesetzt. Als UV-Detektor diente UV1.000 Spectra Series (bei 220 nm) der Firma Thermo Separation Produkts. Weiterhin wurde als Brechungsindexdetektor RI-71, der Fa. Shodex, Tokyo, Japan verwendet. Der Nachweis von Glycinbetain erfolgte mit Hilfe von Brechungsindexmessungen bei einer Wellenlänge von 210 nm. Als Puffer wurde 80%iges Acetonitril verwendet. Die Trennung wurde bei einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt.

Die Aminosäure Prolin wurde mit Hilfe der Fluoreszenzdetektion auf einer *HP 1100* HPLC-Anlage (Hewlett-Packard, Waldbronn) analysiert. Die Proben wurden einer automatischen Vorsäulenderivatisierung mit 10-fachem Überschuß an *o*-Phtaldialdehyd/Borat/3-Mercaptopropionsäure unterzogen. Dadurch reagierten primäre Amine zu thiosubstituierten Isoindolen (Lindroth und Mopper, 1979), welche sich nach der Auftrennung durch ihre Fluoreszenz bei bestimmten Anregungswellenlängen und Emissionswellenlängen detektieren ließen. Nach 5,5 Minuten wurden zur Detektion der sekundären Aminosäure Prolin Anregungs- und Emissionswellenlängen (Ex./Em.) von OPA (Ex.: 230 nm, Em.: 455 nm) auf FMOF (Ex.: 266 nm, Em.: 310 nm) umgestellt. Die Auftrennung der Aminosäurederivate erfolgte durch eine *reversed phase*-Säule (Hypersil ODS5, 5µM, Vorsäule: 40 x 4,6 mm, Hauptsäule 125 x 4,6 mm; CS-Chromatographieservice, Langerwehe). Die Lösungsmittelgradienten von Puffer A (20 mM Natriumacetat, 0,036% Triethylamin, 0,3% Tetrahydrofuran, pH 7,2) und Puffer B (20% 100 mM Natriumacetat pH 7,2, 40% Methanol, 40% Acetonitril) setzten sich wie in Abb. 5 dargestellt zusammen.

Die Auftrennung der Substanzen erfolgte bei 40 °C und einem Fluß von 0,8 - 1 ml/min. Die interne Konzentration der analysierten Stoffe wurde wie folgt berechnet:

$$A_S = \frac{K_S * V}{OD_{600} * F * M_x}$$

A_S : Substratkonzentration in den Zellen [$\mu\text{mol/g BTM}$]

K_S : Substratkonzentration in der injizierten Probe [M]

V: Verdünnungsfaktor

F: Trockengewichtfaktor, für *C. glutamicum* [0,36 mg/ml]/ OD_{600} 1

M_x : Molmasse für jeweiliges Substrat [g/mol]

2.8 Extraktion der Phospholipide in *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betPC252T

Über Nacht-Kulturen von *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betPC252T wurden in BHI-Medium mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol angesetzt und bei 30 °C (125 rpm) inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Kultur überimpft auf OD_{600} von 1 mit BHI-Medium (20 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol und 200 μM IPTG). Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei verschiedenen Temperaturen bis zu einer OD_{600} von 8. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und Membranpräparationen durchgeführt (siehe Abschnitt 2.5.1). Die Membranen wurden in Methanol/Chloroform (2:1) über Nacht bei 4 °C unter Rühren inkubiert und anschließend durch einen Faltenfilter filtriert. Das Eluat wurde zentrifugiert und die organische Phase entnommen. Diese Phase wurde mit Hilfe des Vakuumrotationsverdampfers eingengt. Es folgte ein Waschschriff mit ca. 5 ml Diethylether und anschließendes Einengen mit Hilfe des Vakuumrotationsverdampfers. Zum Entsalzen der Proben wurde eine Spatelspitze Sephadex-G-25 medium (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) auf die getrockneten Lipide gegeben und nochmals mit ca. 10 ml Chloroform gewaschen. Die eingengten Lipide wurden in Chloroform aufgenommen (1 ml Chloroform/100 ml Zellkultur). Das Sephadex-G-25 medium wurde durch Filtration entfernt, die Lipide wurden mit Stickstoff überschichtet und bei -20 °C gelagert.

Die Analyse der Phospholipide erfolgte mit Hilfe der Gaschromatographie (Zusammenarbeit mit A. Lipski, Universität Osnabrück). Die Aufarbeitung der Proben erfolgte nach Lipski und Altendorf, 1996.

2.8.1 Quantifizierung der Phospholipide durch Phosphatveraschung

Für die Quantifizierung der gereinigten Phospholipide mit Hilfe der Phosphatveraschung wurden zunächst 10 µl der Proben getrocknet. Anschließend wurde 300 µl Perchlorsäure zu den Lipiden gegeben und diese eine Stunde bei 180 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit 1 ml H₂O gemischt. 1,25 % Ammoniummolybdat und 5 % Ascorbinsäure (1:1, v/v) wurden frisch angesetzt und 800 µl zugegeben. Die Proben wurden kurz gevortext und 15 min. bei 110 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen folgte die photometrische Bestimmung bei 810 nm. Als Standardlösung wurde KH₂PO₄ verwendet.

Die Analyse der Fettsäuren in Kombination mit den Kopfgruppen der Phospholipide wurde mit Hilfe von LC-ESI-MS/MS (Zusammenarbeit mit C. Ejsing; AG Shevchenko, MPI Dresden) durchgeführt. Die folgenden Standards wurden von Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL) bezogen: 1,1',2,2'-Tetramyristoyl Cardiolipin (Car 14:0/14:0/14:0/14:0), 1,2-Diheptadecanoyl-*sn*-glycero-3-Phosphat (PA 17:0/17:0), 1,2-Diheptadecanoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)] (PG 17:0/17:0). Das folgende Lipid wurde wie in Ekroos *et al.*, 2003 sowie Ejsing *et al.*, 2006 beschrieben, hergestellt: 1,2-Diheptadecanoyl-*sn*-glycero-3-Phosphoinositol (PI 17:0/17:0).

Die massenspektroskopischen Analysen wurden mit Hilfe eines "Multiple precursor ion scanning QSTAR Pulsar *i* quadrupole time-of-flight mass spectrometer" der Firam Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, Canada durchgeführt.

3 Ergebnisse

Unter Kältestress akkumuliert das mesophile Bodenbakterium *C. glutamicum* das kompatible Solut Betain, dessen Aufnahme durch die zwei sekundären Transportsysteme BetP und LcoP vermittelt wird. Eine kältestressbedingte Akkumulation von Prolin wurde ebenfalls in *C. glutamicum* nachgewiesen, wohingegen Aktivitätsstudien über die Kälteantwort des Carriers ProP nicht bekannt sind. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass, neben der Kälteaktivierung der Proteine BetP und LcoP auf Aktivitätsebene, auf Expressionsebene *proP* sowie alle Gene der osmoregulierten BCCT-Carrier, *betP*, *ectP* und *lcoP* bei Kältestress induziert werden. Ein besonders auffälliges Verhalten zeigt der Transporter BetP, der bei 10 °C - 15 °C unter niedrigosmotischen Bedingungen die maximale Aktivität aufweist, welche durch zusätzliche osmotische Stimulierung nicht weiter gesteigert werden kann (Özcan *et al.*, 2005). Mechanismen der Reizwahrnehmung des Transporters BetP unter osmotischem Stress wurden bereits eingehend untersucht. Es konnte mit Hilfe von Proteoliposomen gezeigt werden, dass BetP unter hyperosmotischen Bedingungen sowohl als Osmosensor als auch als Osmoregulator fungiert (Rübenhagen *et al.*, 2001). Ferner war es in diesem *in vitro*-System möglich, den aktivierenden Reiz zu identifizieren. Ausgeschlossen werden konnte dabei, dass BetP durch Änderungen der Membranspannung, der externen Bedingungen sowie durch die interne Ionenstärke oder Osmolalität aktiviert werden kann (Rübenhagen *et al.*, 2001). Vielmehr zeigte sich, dass allein die Steigerung der internen Kaliumkonzentration als Maß für den osmotischen Stress wahrgenommen wird. In dieser Arbeit standen Untersuchungen zu der Fragestellung im Vordergrund, ob BetP ebenfalls als Kältesensor fungiert, und wie die Detektion von Kältestress erfolgt. Dazu wurde der Einfluss der internen Kaliumionenkonzentration bzw. der osmosensorischen Domäne des Proteins auf die Kälteaktivierung analysiert. Darüber hinaus wurde eine mögliche Beteiligung der Membranumgebung an der Kälteaktivierung des Carriers nach Rekonstitution des gereinigten Proteins in Liposomen *in vitro* als auch durch Aktivitätsmessungen nach Adaptation der Zellen an unterschiedliche Temperaturen untersucht. Die *in vivo* gewonnenen Daten konnten durch detaillierte Analysen der Phospholipide der *C. glutamicum*-Zellen bewertet werden.

3.1 Physiologische Untersuchungen zur Kälteanpassung von *C. glutamicum* ATCC 13032

3.1.1 Wachstumsverhalten und Bestimmung des internen Solutgehaltes von *C. glutamicum* ATCC 13032 bei Temperaturerniedrigung

Als mesophiles Bodenbakterium ist *C. glutamicum* ATCC 13032 gegenüber Kältestress durch eine bedeutende Toleranz charakterisiert. Werden exponentiell wachsende *C. glutamicum* Zellen von 30 °C auf niedrigere Temperaturen umgesetzt, so verringert sich die Teilungsrate, allerdings zeigen sie in ihrem Wachstumsverhalten keine Anpassungsphase und wachsen exponentiell weiter. Bei 15 °C konnte durch die Zugabe kompatibler Solute keine Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit erreicht werden (Özcan, 2003). Daher sollte durch weitere physiologische Untersuchungen geklärt werden, ob kompatible Solute bei einer Verstärkung des Kältestresses zu einer schnelleren Stressanpassung führen. In diesem Zusammenhang sollte zum einen die niedrigste Temperatur bestimmt werden, die das Wachstum gerade noch ermöglicht. Weiterhin sollte die Frage einer möglichen Korrelation zwischen der Stärke des eingesetzten Reizes und der Stärke der Kältestressantwort geklärt werden. Dazu wurde das Wachstum von *C. glutamicum* ATCC 13032 bei Temperaturen von 2, 4, 8 und 11 °C mit und ohne externe Verfügbarkeit kompatibler Solute untersucht. Vorkulturen von *C. glutamicum* ATCC 13032 wurden in BHI-Medium bei 30 °C angesetzt und diese über Nacht auf MM1-Medium überführt. Am nächsten Morgen wurden die Zellen auf eine OD₆₀₀ von 1 überimpft (30 °C) und nach Erreichen der exponentiellen Phase bei einer OD₆₀₀ von 4 in temperiertes MM1-Medium überführt, das entweder keine kompatiblen Solute enthielt oder jeweils 10 mM Betain oder Prolin. Es zeigte sich mit Abnahme der Kultivierungstemperatur eine Abnahme der Wachstumsrate. Allerdings war bei allen untersuchten Temperaturen kein Einfluss der externen Verfügbarkeit kompatibler Substanzen auf das Wachstumsverhalten zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Mit und ohne externe Verfügbarkeit kompatibler Solute war bei 2 °C eine Zellteilung innerhalb von ca. 70 Stunden nachweisbar. Weiterhin zeigte sich unter allen Bedingungen das bereits bekannte stetige Wachstumsverhalten von *C. glutamicum* nach Kälteschock der Zellen ohne lag-Phase. Obwohl die Zugabe von Prolin oder Glycinbetain nicht zu einem Wachstumsvorteil führte, wurde untersucht, ob Unterschiede in der Zusammensetzung des Cytoplasmas messbar waren. Dazu wurde die interne Solut-Zusammensetzung bei 2 °C mit Hilfe der HPLC analysiert. Die dabei zu klärende Frage war, ob eine mögliche Korrelation zwischen der Stärke des eingesetzten Reizes und der Stärke einer Stressantwort zu finden ist. Eine deutliche Akkumulation von Prolin bei 15 °C gewachsenen *C. glutamicum* Zellen ist bereits bekannt (Özcan, 2003). Eine möglicherweise

stärkere Akkumulation bei 2 °C sollte geklärt werden. In Abb. 5 sind die internen Prolinkonzentrationen bei 2 °C im Vergleich zu 15 °C und 30 °C dargestellt. In Abhängigkeit zur Wachstumsgeschwindigkeit bei Kältestress wurde das Zeitfenster bei der Probenentnahme angepasst. Im Folgenden werden zunächst temperaturabhängige interne Prolinkonzentrationen in Zellen bei externer Verfügbarkeit von Betain (Dreiecke) und ohne Zusätze (Rechtecke) diskutiert. In kältegeschockten Zellen konnte bei 15 °C sowie bei 2 °C

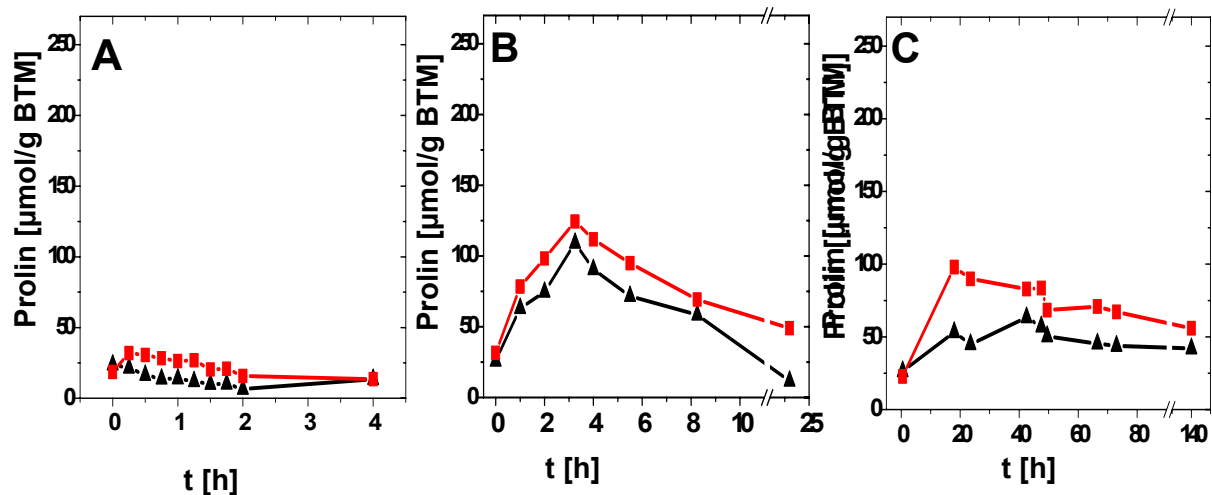


Abb. 5 Interne Prolinkonzentration von *C. glutamicum* ATCC 13032 nach Kultivierung bei verschiedenen Temperaturen. Eine Vorkultur der Zellen wurde bei 30 °C in BHI-Medium, dann in MMI-Minimalmedium angezogen, nochmals auf MMI-Medium überimpft und nach Erreichen einer OD_{600} von 4 auf 30 °C (A), 15 °C (B) und 2 °C (C) temperiertes MMI- Minimalmedium ohne Zusatz kompatibler Solute (Rechtecke) und mit 10 mM Betain (Dreiecke) überführt. Die Daten aus (A) und (B) wurden aus der Diplomarbeit, Özcan, 2003 entnommen.

eine deutliche Prolinakkumulation mit Maximalwerten von ca. 80-100 $\mu\text{mol/g BTM}$ detektiert werden, während bei optimaler Wachstumstemperatur lediglich basale Werte von ca. 20 $\mu\text{mol/g BTM}$ vorlagen. Bei allen Temperaturen wurde bei externer Verfügbarkeit von Betain ca. 20 % weniger Prolin akkumuliert. Die Prolinakkumulation bei 2 °C wies dabei einen deutlichen Unterschied zu der Aufnahme bei 15 °C auf. Bei 15 °C spiegelt sich die Prolinakkumulation in Form einer Optimumskurve wieder, die ca. 4 Stunden nach Kälteschock Maximalwerte aufweist. Im Gegensatz dazu wird die maximale Prolinakkumulation bei 2 °C 20 Stunden nach Kälteschock erreicht, wobei dieser Wert auch innerhalb der nächsten 120 Stunden auf diesem Niveau bleibt. Bezüglich der Frage einer möglichen Korrelation zwischen der Stärke des eingesetzten Reizes und der Stärke einer Stressantwort kann somit im Fall der Biosynthese des kompatiblen Solutes Prolin gefolgert werden, dass bei verstärktem Kältestress durch Kultivierung bei 2 °C keine höheren Prolinkonzentrationen im Vergleich zu 15 °C akkumuliert werden.

Wurde dem Medium jedoch Prolin zugegeben, so zeigte sich bei 30 °C 2 Stunden nach Umsetzen der Zellen eine interne Prolinkonzentration von ca. 80 $\mu\text{mol/g}$ BTM, während die Konzentration bei 2 °C mit 240 $\mu\text{mol/g}$ BTM um den Faktor 3 höher lag (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurde der interne Betainpool in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur untersucht. In Abb. 6 ist die interne Betainkonzentration in *C. glutamicum* ATCC 13032 bei 15 °C (Abb. s. Özcan, 2003) und bei 2 °C dargestellt. In beiden Fällen zeigte sich nach Überführen der Zellen in kaltes Medium ein deutlicher Anstieg der internen Betainkonzentrationen. Die interne Betainkonzentration bei 15 °C gewachsenen Zellen stieg innerhalb der ersten 8 Stunden auf von ca. 25 $\mu\text{mol/g}$ BTM auf 120 $\mu\text{mol/g}$ BTM an und verringerte sich innerhalb weitere 17 Stunden bis auf den Anfangswert. Die interne Betainkonzentration bei 2 °C zeigte ebenfalls einen deutlichen Anstieg mit zunehmender

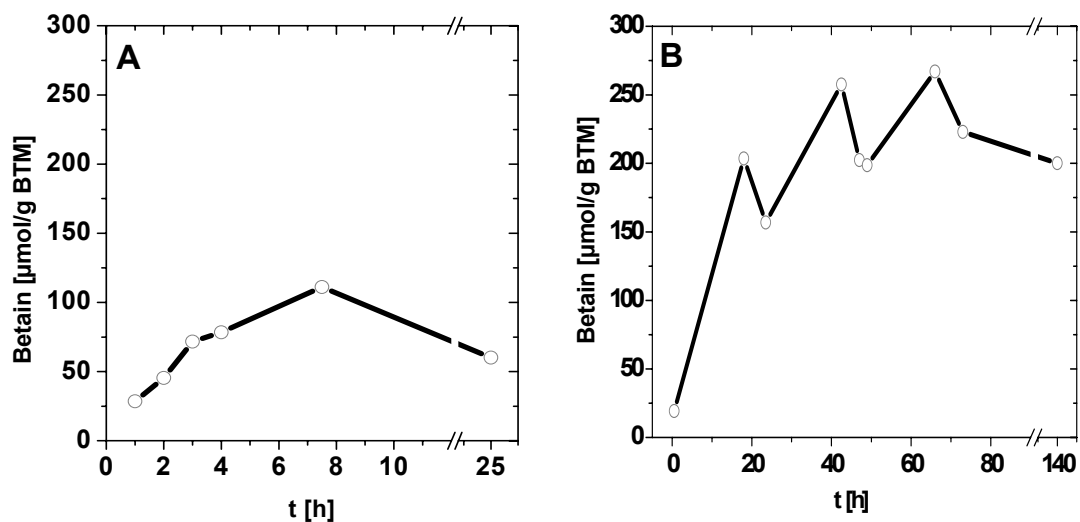


Abb. 6 Interne Betainkonzentration von *C. glutamicum* ATCC 13032 bei verschiedenen Kultivierungstemperaturen. Eine Vorkultur der Zellen wurde bei 30°C in BHI-Medium, dann in MMI-Minimalmedium angezogen, nochmals auf MMI-Medium überimpft und nach Erreichen einer OD_{600} von 4 auf 15 °C (A), (Özcan, 2003) und 2 °C (B) temperiertes MMI- Minimalmedium überführt.

Kultivierungsdauer. Während bei 2 °C kurz nach Kälteschock eine mit 15 °C vergleichbare Menge von ca. 25 $\mu\text{mol/g}$ BTM detektiert wurde, lag die maximale Betainkonzentrationen nach ca. 60 Stunden mit 250 $\mu\text{mol/g}$ BTM deutlich höher als bei 15 °C. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass grundsätzlich in *C. glutamicum* ATCC 13032 bei Kältestress Glycinbetain akkumuliert wird. Dabei verbleibt bei starkem Kältestress, im Vergleich zu 15 °C, das aufgenommene kompatible Solut über sehr lange Zeit in den Zellen. Im Gegensatz zu Prolin hat im Fall von Glycinbetain eine Verstärkung des Kältestresses höhere Betainakkumulationen zur Folge, was eine deutliche Korrelation zwischen der Stärke des eingesetzten Reizes und der Stärke einer Stressantwort darstellt.

3.1.2 Immunologischer Nachweis von BetP und EctP in *C. glutamicum* ATCC 13032 in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur

Neben der Regulation der Aktivität wurde bereits mit Hilfe von RNA-Hybridisierungsexperimenten nachgewiesen, dass die Gene der Carrier der BCCT-Familie als Antwort auf einen Kälteschock stärker exprimiert werden (Özcan, 2003). Besonders auffällig erschien dabei die relativ hohe Basisexpression bzw. die geringe Kälteinduktion von *betP* im Vergleich zu *lcoP* und *ectP*, die sich lediglich in einer Verdopplung der Transkriptmenge zeigte. Diese geringe Regulation auf Transkriptionsebene könnte möglicherweise durch eine andere Regulation von *betP* auf Translationsebene bedingt sein. Diese Beobachtung war deshalb von Interesse, da die *betP*-RNA zu einer Klasse von mRNA gehört, bei denen Transkriptions- und Translationstart identisch sind. Dieser Klasse der mRNA fehlt die Shine-Dalgarno-Sequenz, die üblicherweise für eine effektive Initiation der Translation essentiell ist. Es konnte bereits in *E. coli* dokumentiert werden, dass anders als bei optimalen Temperaturbedingungen, diese sogenannte *leaderless* mRNA bei Kälte vergleichsweise besser translatiert wird (Grill *et al.*, 2002). Somit wären bessere Synthesebedingungen einiger Proteine bei Kälte gegeben als unter normalen Bedingungen. Auf BetP bezogen könnte daraus gefolgert werden, dass die bevorzugte Translation von *leaderless* mRNAs eine Verstärkung des Signals zur Folge hat, so dass trotz geringer Transkriptionssteigerungen eine effektive Translation die BetP-Menge in den Zellen stark erhöht. Als Kontrolle wurde die Proteinmenge von EctP bei verschiedenen Kultivierungsbedingungen hinzugezogen, da *ectP*-RNA nicht zur Klasse der *leaderless* mRNA gehört.

In Anlehnung an diese Erkenntnisse wurde in diesem Abschnitt eine mögliche Korrelation zwischen der Transkriptions- und Transportebene durch Untersuchungen der BetP- und EctP-Konzentrationen nach Temperaturerniedrigung untersucht. Dazu wurde der Stamm *C. glutamicum* ATCC 13032 bei verschiedenen Temperaturen kultiviert. Nach definierten Zeitpunkten wurden Zellen entnommen, die Membranen isoliert und anschließend gleiche Proteinmengen mit Hilfe von SDS-PAGE getrennt. Spezifische BetP- bzw. EctP-Antikörper wurden verwendet, um die temperaturabhängige Menge an synthetisierten Carriern durch Western-Blot-Analysen immunologisch nachzuweisen und mit Hilfe des Computerprogrammes PCBAS 2.09 zu quantifizieren. Die detektierte temperaturabhängige BetP-Menge ist in Abb. 7A in relativer Darstellung abgebildet. Die vor Überführen der Zellen quantifizierte Proteinmenge entspricht 100 %. Die bei 15 °C kultivierten Zellen zeigten innerhalb einer Zweifachbestimmung mit zunehmender Kultivierungsdauer keine deutliche Änderung der BetP-Proteinkonzentration. Demgegenüber konnte bei einer Temperatur von 15 °C eine deutliche Zunahme der BetP-Konzentration mit zunehmender Zeit beobachtet

werden, so dass nach 20 Stunden eine um den Faktor 2 höhere BetP-Menge quantifiziert wurde. Die detektierte Proteinmenge bei 30 °C kultivierten Zellen nahm anfangs leicht zu bzw. blieb innerhalb der ersten Stunden auf gleichem Niveau. Es zeigte sich bei zunehmender Kultivierungsdauer eine deutliche Reduzierung der BetP-Menge auf Werte von ca. 40 – 60 % der zu Anfang gemessenen Konzentrationen.

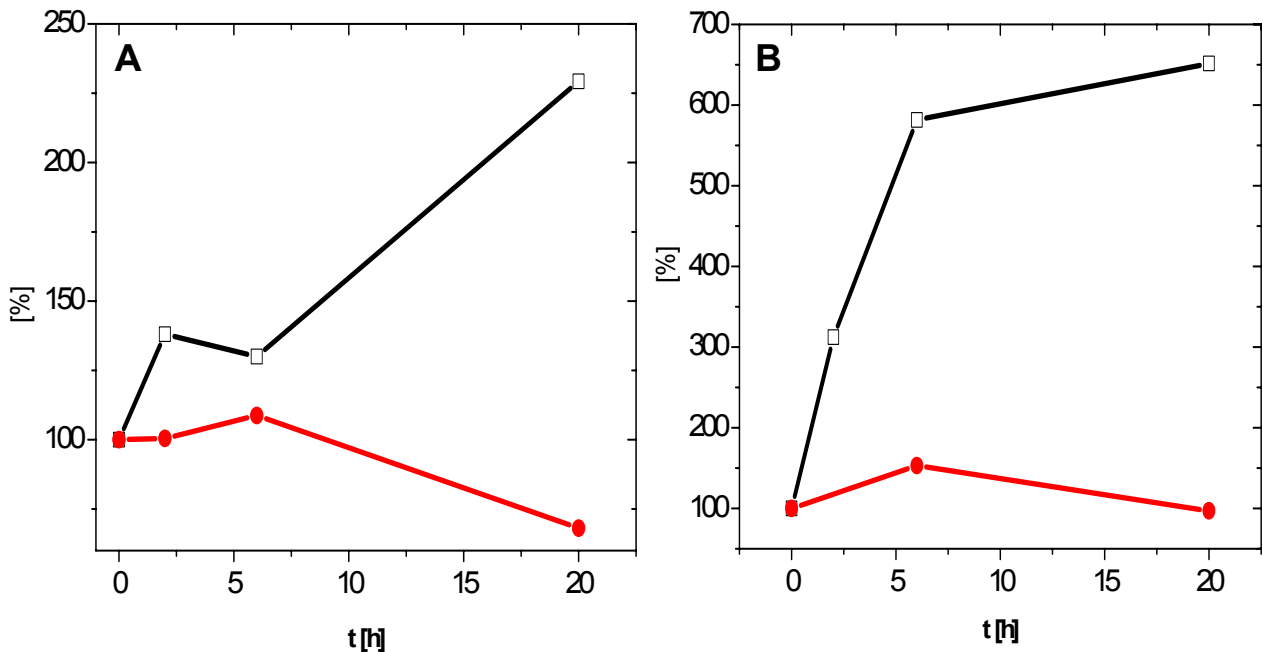


Abb. 7 Immunologischer Nachweis von BetP und EctP in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur in *C. glutamicum* ATCC 13032. Dargestellt ist die quantifizierte relative Proteinmenge vor und 2, 6, 20 Stunden nach Überführen der Zellen in temperiertes Medium, 15 °C (Quadrate), 30 °C (Kreise), BetP (A), EctP (B). Die vor Überführen der Zellen quantifizierte Proteinmenge entspricht 100 %.

Die detektierte temperaturabhängige EctP-Menge ist in Abb. 7B in relativer Darstellung abgebildet. Hier zeigte sich bei Kultivierung bei 30 °C eine nahezu auf gleichem Niveau bleibende Proteinmenge innerhalb von 20 Stunden. Bei Temperaturerniedrigung auf 15 °C konnte eine Zunahme der EctP-Konzentration auf 5 fach höhere Werte detektiert werden. Wurden die Zellen demgegenüber bei 15 °C angezogen, so zeigte sich mit zunehmender Kultivierungsdauer eine signifikante Steigerung der EctP-Konzentration, die nach 20 Stunden nach Umsetzen der Zellen um den Faktor 6,5 höher lag.

Somit zeigten die physiologischen Untersuchungen zur Kälteanpassung von *C. glutamicum* eine vermehrte Synthese der Carrier BetP und EctP bei Temperaturerniedrigung auf 15 °C. Der Effekt der kälteinduzierten Proteinsynthese bei EctP war mit einem Faktor von 5 deutlich ausgeprägter im Vergleich zu BetP. Zusammenfassend konnte bezüglich der Ausgangsfragestellung keine bevorzugte Translation der *leaderless* mRNA bei

Temperaturerniedrigung beobachtet werden. Dennoch wurde, neben der bereits dokumentierten temperaturabhängigen Expressionsregulation der beiden Transporter bzw. im Fall von BetP neben der ebenfalls bekannten Aktivitätsregulation, eine vermehrte Synthese der Proteine BetP und EctP bei Kältestress nachgewiesen.

3.2 Temperaturabhängige Aktivierung von BetP C Δ 25 in *C. glutamicum* DHPF

Durch physiologische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass *C. glutamicum* bei einer Langzeitadaptation auf Kältestress mit einer verstärkten Akkumulation von kompatiblen Soluten reagiert. Da das Betain-Aufnahmesystem BetP die stärkste Aktivitätsregulation bei einer plötzlichen Temperaturänderung zeigte, sollte die Kälteaktivierung des Carriers durch detaillierte Untersuchungen charakterisiert werden. Untersuchungen zur Bestimmung des BetP aktivierenden Reizes bei Kältestress durch Quantifizierung der Kaliumionen-Konzentration im Cytoplasma von *C. glutamicum* Zellen, die einem Kälteschock ausgesetzt waren, haben gezeigt, dass die interne Kaliumkonzentration, im Gegensatz zur Detektion hyperosmotischer Bedingungen, keinen Einfluss auf die Kälteaktivierung ausübt (Özcan, 2003).

Die Osmoregulation und Osmosensorik von BetP erfolgt unter Beteiligung der endständigen 25 Aminosäuren der C-terminalen Domäne (Peter *et al.*, 1998b; Schiller, 2004). Die C-terminal verkürzte Mutante BetP C Δ 25 weist bei Zunahme der externen Osmolalität eine auf gleichem Niveau bleibende Aktivität auf, d.h. einen durch osmotischen Stress nicht weiter stimulierbaren Transport. Detaillierte Untersuchungen zeigten, dass die C-terminal verkürzte Mutante BetP C Δ 25 unabhängig von der internen Kaliumionenkonzentration immer die gleiche Aufnahmerate aufweist, und sie somit ihre osmoregulatorischen Eigenschaften verloren hat (Schiller *et al.*, 2004). Im Folgenden sollte abschließend geklärt werden, ob die kaliuminsensitive Mutante BetP C Δ 25, die nicht mehr osmotisch reguliert ist, weiterhin durch Kältestimulierung aktiviert werden kann. Dies würde bedeuten, dass BetP unterschiedliche Sensoren für Osmo- und Kältestress besitzt. Dazu wurde der Stamm *C. glutamicum* DHPFpbetP C Δ 25 verwendet. Da im Stamm DHPF die Gene aller bekannten Transporter (Δ betP, Δ proP, Δ putP, Δ ectP, Δ lcoP) für kompatible Solute deletiert sind, erfolgt eine Aufnahme kompatibler Solute ausschließlich nach Induktion der plasmid-kodierten Transporter.

Um die Aktivität von BetP nach einer plötzlichen Temperaturänderung zu messen, wurden die Zellen wie folgt vorbereitet. Die Zellen wurden über Nacht in BHI-Medium mit IPTG bei 30 °C (120-130 rpm) angezogen, zentrifugiert und in Basispuffer gewaschen. Nach

Resuspension im gleichen Puffer wurde eine OD_{600} von 1 eingestellt. Die Energetisierung der Zellen erfolgte durch Zugabe von 10 mM Glukose. Bis zu den Messungen wurden die Zellen auf Eis gelagert. Vor Beginn der Aufnahmemessungen wurden die Zellen bei verschiedenen Temperaturen für 3 min. inkubiert. Der Start der Messungen erfolgte durch die Zugabe von 250 μ M [14 C]-markiertem Betain. Da die Zellen ausschließlich für 3 Minuten variierenden Temperaturen ausgesetzt wurden, und die Probenentnahme im 15 Sekundentakt nach Substratzugabe erfolgte, repräsentiert das temperatur- oder salzabhängige Aktivierungsprofil des Carriers eine sehr schnelle Antwort auf den jeweiligen Stress. Verglichen wurde das temperaturabhängige Aktivierungsprofil von BetP C Δ 25 unter niedrigosmotischen (ca. 0,2 osmol/kg) sowie hochosmotischen (ca. 1,2 osmol/kg) Bedingungen.

In Anbetracht identischer Bedingungen im Vergleich zu Transportmessungen des Wildtyp BetP wurden zunächst gleiche Messpuffer gewählt. In Abb. 8 ist die temperaturabhängige

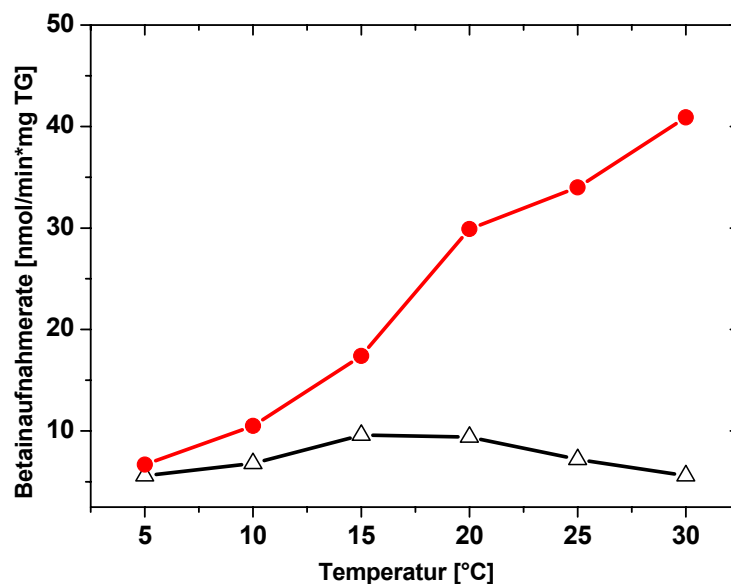


Abb. 8 Einfluss der Temperatur auf Aktivität von BetP C Δ 25 im Stamm *C. glutamicum* DHPFpbetP C Δ 25. Glycinbetain-Aufnahmerate von BetP Δ 25 bei unterschiedlichen Temperaturen unter niedrigosmotischen Bedingungen mit 50 mM KP_i , 50 mM NaCl; pH 7,5 (Dreiecke) und unter hochosmotischen Bedingungen mit 50 mM KP_i , 600 mM NaCl; pH 7,5 (Kreise). Der Basispuffer enthielt 50 mM KP_i , pH 7,5. Die Aufnahmemessung wurde durch Zugabe von 250 μ M 14 C-Glycinbetain gestartet.

Glycinbetain-Aufnahmerate von BetP C Δ 25 dargestellt. Unter hochosmotischen Bedingungen zeigte sich eine deutliche Zunahme der Glycinbetain-Aufnahmerate mit steigender Temperatur und einer maximalen Aktivität bei 30 °C mit ca. 40 nmol/min*mg TG. Im Gegensatz dazu war bei Temperaturvariationen unter niedrigosmotischen Bedingungen eine leichte Kälteaktivierung bei 15 °C mit einer Aufnahmerate von ca. 10 nmol/min*mg TG

zu beobachten. Erstaunlich dabei war die bei 30 °C gemessene Diskrepanz zwischen hoch- und niedrigosmolaren Bedingungen, da BetP CΔ25, nach dem bereits bekannten Aktivierungsprofil, bei variierendem osmotischen Stress durch Zunahme osmotischen Stresses nicht weiterhin aktivierbar bzw. dereguliert ist.

Zur Charakterisierung der BetP CΔ25 Mutante erwies sich der Standardpuffer als ungeeignet, da die Natriumkonzentration zu gering war. Es wurde vermutet, dass die Aktivitäten bei geringen Osmolalitäten durch zu geringe Natriumkonzentrationen im Puffer verursacht wurden (BetP ca. 70 mM NaCl; BetP CΔ25 ca. 370 mM). Für die folgenden Aufnahmemessungen wurden somit höhere Natriumkonzentrationen in den Messpuffern mit 50 mM NaP_i, 50 mM NaCl, pH 7,5 bzw. 50 mM NaP_i, 600 mM NaCl, pH 7,5 verwendet (Daten nicht gezeigt). Erneut zeigte sich unter hochosmotischen Bedingungen eine Zunahme der Glycinbetain-Aufnahmerate mit steigender Temperatur und einer maximalen Aktivität bei 30 °C mit ca. 30 nmol/min*mg TG. Demgegenüber war ohne osmotische Stimulierung weiterhin eine deutliche Kälteaktivierung des Proteins zu beobachten (17 nmol/min*mg TG bei 10 °C), die Diskrepanz zwischen beiden Osmolalitäten bei 30 °C blieb trotz Erhöhung der Natriumkonzentration erhalten.

Im Folgenden sollte der Einfluss hochosmotischer Bedingungen auf Regulation von BetP CΔ25 durch weitere Variationen der Messpuffer genauer charakterisiert werden. Abb. 9 zeigt die temperaturbedingte Aktivierung der C-terminal deletierten BetP Mutante unter hochosmotischen Bedingungen mit variierenden NaCl- und KCl-Konzentrationen. Die Aufnahmemessungen mit 600 mM NaCl zeigten einen typischen Kurvenverlauf nach Arrhenius mit einer maximalen Aktivität bei 30 °C mit ca. 53 nmol/min*mg TG. Bei einer annähernd gleichbleibend hohen externen Osmolalität und einer stetigen Erhöhung der KCl-Konzentration konnte folgendes Ergebnis beobachtet werden. Ausgehend von einer osmotischen Stimulierung durch 600 mM NaCl zeigte sich, mit stetigem Ersetzen des NaCl-Anteils durch KCl, ein Übergang des temperaturabhängigen Aktivierungsprofils von einer Arrhenius-Beziehung hin zur Kälteaktivierung in Form einer Optimumskurve bei Stimulierung durch 500 mM KCl. Die maximale Kälteaktivierung wurde unter diesen Bedingungen bei 20 °C erreicht. Zusammenfassend lässt sich ein entscheidender Einfluss der eingesetzten NaCl-Konzentration auf die temperaturabhängige Aktivierung von BetP CΔ25 feststellen. Die Einstellung hochosmotischer Bedingungen durch Zugabe von NaCl bzw. KCl führte dabei zu unterschiedlichen temperaturabhängigen Aktivierungsprofilen von BetP CΔ25.

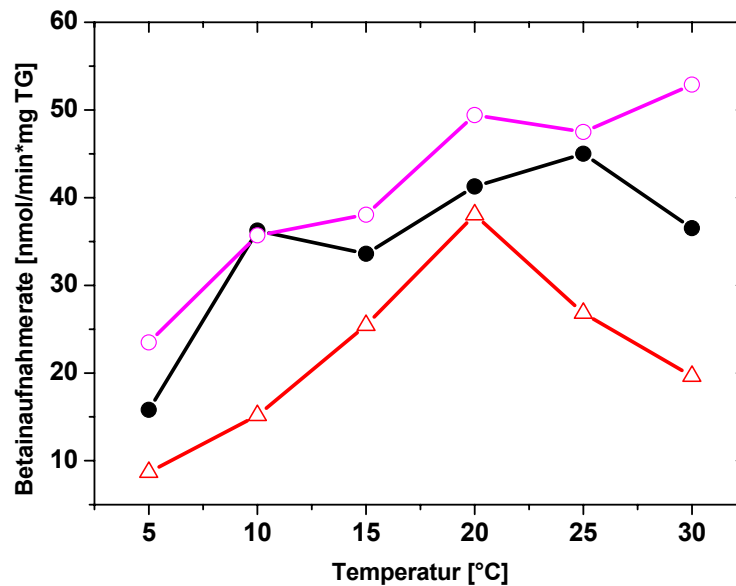


Abb. 9 Einfluss der Temperatur auf Aktivität von BetP CΔ25 im Stamm *C. glutamicum* DHPFbetP Δ25. Glycinbetain-Aufnahmerate von BetP Δ25 bei variiertem Temperatur unter hochosmotischen Bedingungen mit 25 mM KP_i , 100 mM NaCl, 500 mM KCl (Dreiecke), 25 mM KP_i , 300 mM NaCl, 300 mM KCl (geschlossene Kreise), 25 mM KP_i , 600 mM NaCl (offene Kreise). Der Basispuffer enthielt 25 mM KP_i , pH 7,5. Die Aufnahmemessung wurde durch Zugabe von 250 μ M ^{14}C -Glycinbetain gestartet.

Da der Einsatz von NaCl bzw. KCl für die Einstellung hochosmotischer Bedingungen zu einem deutlich unterschiedlichen Aktivierungsprofil führte, sollte dieser Effekt durch weitere temperaturabhängige Aufnahmemessungen von BetP CΔ25 abgesichert werden. So wurde der Versuchsaufbau derart variiert, dass unter niedrig- und hochosmolaren Bedingungen die gleiche Natriumkonzentration (100 mM NaCl) vorlag. Die Osmolalität wurde in diesem Fall durch KCl eingestellt. Abb. 10 zeigt die temperaturabhängige Glycinbetain-Aufnahmerate von BetP CΔ25 mit 100 mM NaCl in An- und Abwesenheit von 500 mM KCl. Unabhängig von der Osmolalität zeigen beide Graphen einen übereinstimmenden Verlauf und erreichten in Form von Optimumskurven bei 15 °C maximale Aufnahmeraten von ca. 42 nmol/min*mg TG. Die zuvor beobachtete Diskrepanz der Aktivität bei 30 °C bei verschiedenen Osmolalitäten ist unter diesen Bedingungen nicht mehr erkennbar. Nach osmotischer Stimulierung durch KCl scheint BetP CΔ25 nur noch einer Kältereulation zu unterliegen. Bei hoher Osmolalität ist, anders als im Wildtyp, keine Stimulierung der Aktivität bei steigender Temperatur nach Arrhenius zu beobachten. Zusammenfassend ist in beiden Fällen eine Kälteinduzierbarkeit des Proteins zu beobachten, so dass eine Beteiligung der C-terminalen 25 Aminosäuren an der Kälteantwort von BetP ausgeschlossen werden kann.

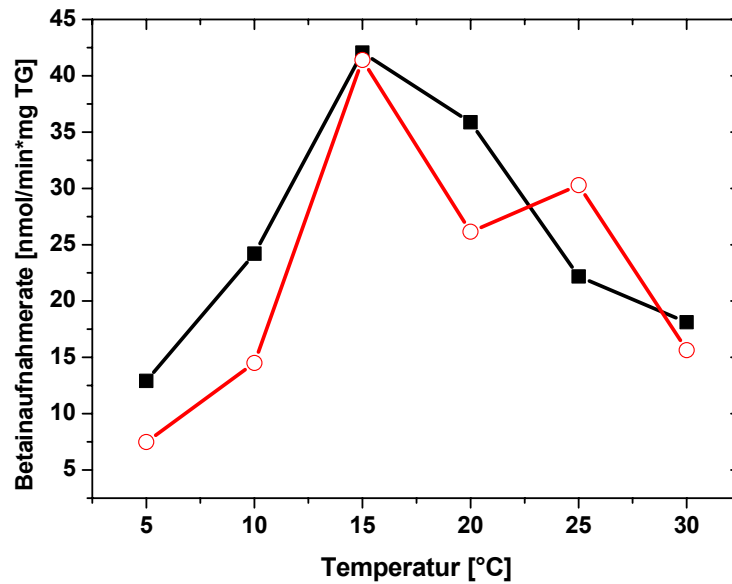


Abb. 10 Einfluss der Temperatur auf Aktivität von BetP CΔ25 im Stamm *C. glutamicum* DHPFbetP Δ25. Glycinbetain-Aufnahmerate von BetP Δ25 bei variierenden Temperaturen und konstanter NaCl-Konzentration unter niedrig- und hochosmotischen Bedingungen. Der Basispuffer enthielt 25 mM KP_i , pH 7,5. Messpuffer: 25 mM KP_i , 100 mM NaCl (Quadrate) und 25 mM KP_i , 100 mM NaCl, 500 mM KCl (Kreise). Die Aufnahmemessung wurde durch Zugabe von 250 μ M ^{14}C -Glycinbetain gestartet.

Um eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz der temperaturabhängigen Aktivierungsprofile von BetP CΔ25 bei niedriger und hoher externer NaCl-Konzentration zu erhalten, wurde zum einen der Frage nachgegangen, ob bei 30°C eine geringere Natriumaffinität vorliegt als bei 15°C oder 20°C, d.h. möglicherweise ein temperaturabhängiger K_m -Wert vorliegt. Wie in Tab. 5 dargestellt, zeigten die Bestimmungen von BetP CΔ25 bei einer Temperatur von 30°C eine K_m -Wert für Natrium von ca. 86 mM und bei 15°C von ca. 118 mM. Somit konnte der K_m -Wert als Ursache für die bei 30°C nachgewiesene Diskrepanz ausgeschlossen werden, da bei verschiedenen Messtemperaturen eine ähnliche Natriumaffinität der C-terminal deletierten BetP-Mutante bestätigt wurde. Entsprechend konnten die Natriumaffinitäten nicht als Erklärung für die unterschiedlichen Aktivierungsprofile von BetP CΔ25 bei osmotischer Stimulierung durch Natrium oder Kalium herangezogen werden.

Weiterhin wurde die Natriumaffinität des Transporters BetP bestimmt. Die Aufnahmemessungen erbrachten K_m -Werte für Natrium von 62 mM Na^+ . Diese Messungen führten somit zu annähernd gleichen Werten im Vergleich zu bereits bekannten (Schiller, 2004).

Tab. 5 Kinetische Parameter von BetP und BetP CΔ25 im Stamm *C. glutamicum* DHPFbetP.

Protein	Messtemperatur	Na ⁺
		K _m [mM]
BetP	30 °C	62 ± 10
BetP CΔ25	30 °C	118 ± 39
BetP CΔ25	15 °C	86 ± 19

3.3 Temperaturabhängige Aktivierung von BetP wt in *E.coli* MKH13

BetP fungiert als Osmosensor, indem das Protein die interne Kaliumkonzentration als Maß für den osmotischen Stress wahrnimmt (Rübenhagen *et al.*, 2000). Die interne Kaliumkonzentration als Stimulus für die Kälteaktivierung von BetP konnte bereits durch zwei unterschiedliche Methoden, d.h. durch Quantifizierung der temperaturunabhängigen internen Kaliumkonzentration sowie durch den Nachweis der Kältestresssensitivität der kaliuminsensitiven Mutante BetP CΔ25, ausgeschlossen werden. An dieser Stelle sollte untersucht werden, ob der Carrier möglicherweise die Eigenschaft besitzt, neben osmotischem Stress ebenfalls Kältestress wahrzunehmen und dadurch als Kältesensor fungiert, oder ob möglicherweise ein zweites Protein für die Kälteaktivierung des Transporters verantwortlich ist. Um dies zu untersuchen, wurde das *betP* Gen heterolog im Stamm *E. coli* MKH13 *pbetP* exprimiert. Der Stamm zeichnet sich dadurch aus, dass die Gene der *E. coli* eigenen Transporter für kompatible Solute, *putPA*, *proP* und *proU*, deletiert sind. In diesem heterologen System ist das Protein nach wie vor in der Lage, osmotischen Stress wahrzunehmen und seine Aktivität zu regulieren. Das Aktivierungsprofil ist im Vergleich zu *C. glutamicum* durch eine erhöhte Salzsensitivität gekennzeichnet, so dass zur osmotischen Stimulierung des Proteins eine vergleichsweise geringere externe Osmolalität benötigt wird (Schiller *et al.*, 2004).

In Abb. 11 ist die temperaturabhängige Betainaufnahme des Carriers bei verschiedenen externen Osmolalitäten dargestellt, jede Bedingung wurde mindestens zweimal untersucht. Als Basispuffer wurde 50 mM KP_i, pH 7,5 verwendet. Unter hochosmotischen Bedingungen (250 mM NaCl) zeigte sich eine Zunahme der Transportrate mit ansteigender Temperatur, der höchste Wert wurde bei 25 °C mit ca. 110 nmol/min*mg TG gemessen. Bei einer geringeren externen Osmolalität mit 150 mM NaCl zeigte sich eine geringfügige Zunahme

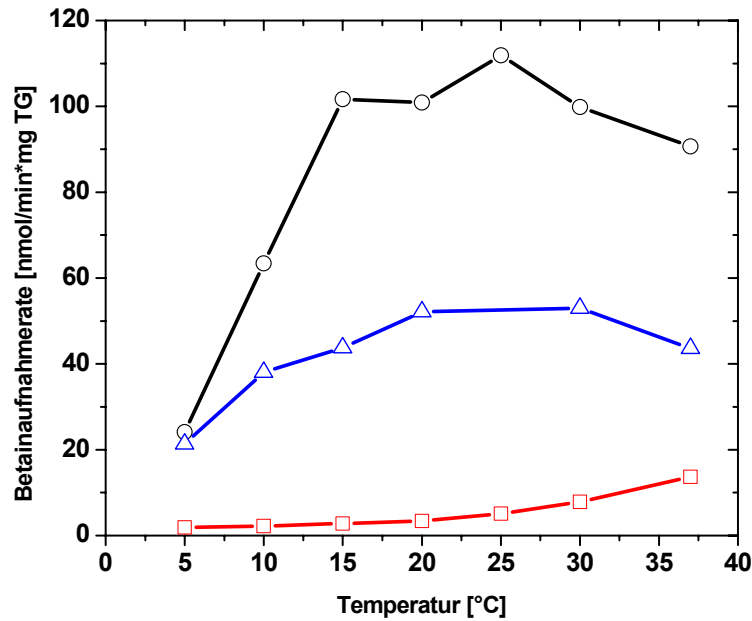


Abb. 11 Einfluss der Temperatur auf Aktivität von BetP im Stamm *E.coli* MKH13pbetP.

Glycinbetain-Aufnahmerate von BetP bei variiertem Temperatur und in Abhängigkeit von der externen Osmolarität. Als Basispuffer wurde 50 mM KP_i , pH 7,5 verwendet, 50 mM NaCl (Quadrate), 150 mM NaCl (Dreiecke), 250 mM NaCl (Kreise). Die Aufnahmemessung wurde durch Zugabe von 250 μ M ^{14}C -Glycinbetain gestartet.

der Aufnahmerate mit steigender Temperatur, die bei 20 °C mit ca. 50 nmol/min*mg TG den Maximalwert erreichte und bei weiterer Temperaturerhöhung nahezu unverändert blieb. Unter niedrigosmotischen Bedingungen (50 mM NaCl) konnte bei Temperaturerhöhung bis 20 °C kaum Aktivität nachgewiesen werden. Erst bei weiterer Temperaturerhöhung nahm die Transportrate leicht zu und erreichte den Maximalwert von ca. 15 nmol/min*mg TG bei 37 °C. Das Aktivierungsprofil unter niedrigosmotischen Bedingungen spiegelte sich somit in einer Arrhenius-Beziehung wieder. Zusammenfassend bedeutet dies einen Verlust der Kälteaktivierung von BetP nach heterologer Expression in *E. coli*. Eine Erklärungsmöglichkeit dafür dass das Protein in diesem heterologen System nicht mehr durch Kältestress aktivierbar ist, könnte darin liegen, dass möglicherweise ein zweites (Sensor-) Protein, das für die Aktivierung verantwortlich ist, in *E. coli* nicht exprimiert wird. Des Weiteren könnte der Grund für dieses Verhalten in der unterschiedlichen Lipidzusammensetzung liegen. Während die Plasmamembran von *E. coli* zu 80 % aus Phosphatidylethanolamin (PE), 15 % Phosphatidylglycerol (PG) und 5 % Cardiolipin (Diphosphatidylglycerol, DPG) besteht (Prasad, 1996), ist die Plasmamembran von *C. glutamicum* aus nahezu gleichen Anteilen von PG, PI und Cardiolipin zusammengesetzt. Somit ist die Oberfläche der *C. glutamicum* Membran zum größten Teil negativ geladen. Es konnte gezeigt werden, dass die erhöhte

Osmosensitivität des Transporters in *E. coli* an dem vergleichsweise geringen Anteil negativ geladener Phospholipide der Membran liegt (Schiller *et al.*, 2004).

Ein möglicher Einfluss der Membranumgebung auf die temperaturabhängige Aktivierung von BetP sollte im Folgenden durch Einsatz des Lokalanästhetikums Tetracain *in vivo* untersucht werden. Weiterhin sollte der Einfluss der Membran auf die Kälteaktivierung nach Rekonstitution des Proteins in Liposomen verschiedener Lipidzusammensetzung *in vitro* näher charakterisiert werden.

3.4 Einfluss des Lokalanästhetikums Tetracain auf die Kälteaktivierung von BetP in *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T

Zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung der Membranumgebung an der Kälteaktivierung von BetP wurde der Einfluss des Lokalanästhetikums Tetracain bestimmt. Dazu wurde das *betP* Gen homolog in *C. glutamicum* DHPF exprimiert.

Amphiphile Lokalanästhetika, wie beispielsweise Tetracain (positive Nettoladung unter physiologischen Bedingungen), beeinflussen den physikalischen Zustand einer biologischen Membran signifikant (Peter *et al.*, 1998). Es wird vermutet, dass diese Substanzen die intrinsische Membranspannung und/oder die Ladungsverteilung an den Oberflächen der Lipiddoppelschicht verändern. Daher werden diese Substanzen häufig genutzt, um den Einfluss der Phospholipidumgebung auf die katalytische Aktivität integraler Membranproteine zu untersuchen (Lambert *et al.*, 1995; Peter *et al.*, 1998b; Rübenhagen *et al.*, 2000; van der Heide *et al.*, 2001). Der spezifische Wirkmechanismus von Tetracain auf einzelne Proteine ist jedoch bis heute nicht geklärt. Sowohl *in vivo*, als auch *in vitro*, reagiert BetP bei einer Messtemperatur von 30 °C auf die Zugabe von Tetracain mit einer erhöhten Glycinbetain-Aufnahmeaktivität, was phänomenologisch der Reaktion auf hyperosmotischen Stress sehr ähnelt (Peter *et al.*, 1998b; Rübenhagen *et al.*, 2000). Eine Steigerung der BetP Aktivierung durch Tetracain wurde bei gleichzeitiger osmotischer Vorstimulierung durch 400 mM NaCl nachgewiesen (Peter *et al.* 1998). Es konnte gezeigt werden, dass nicht die Oberflächenladung der Membran, sondern eher die Membranfluidität und/oder Membranspannung die Aktivierung von BetP moduliert, da auch Lokalanästhetika mit unterschiedlicher Ladung den Transporter stimulieren (Steger, 2002).

Im Folgenden wurde der Einfluss des Lokalanästhetikums auf die temperaturabhängige BetP Aktivierung untersucht. Dazu wurde *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T bei 30 °C kultiviert. Die Temperatur während der Messungen betrug 10 °C bzw. 30 °C. Weiterhin wurde sowohl die Osmolalität als auch die Tetracainkonzentration variiert. Das Ergebnis ist in Abb. 12 dargestellt. Die tetracainabhängigen Aufnahmeraten unter niedrigosmotischen

Bedingungen (50 mM NaCl) und bei 30 °C zeigten steigende Aktivitäten mit zunehmender externer Tetracainkonzentration. Bei einer externen Salzkonzentration von 100 mM NaCl und einer Messtemperatur von 30 °C wurde ebenfalls eine Zunahme der Aktivität mit steigender Tetracainkonzentration beobachtet. Die maximale Stimulierung wurde bei 0,8 bzw. 1,2 mM Tetracain mit ca. 65 nmol/min*mg TG erreicht. Wurde die externe Salzkonzentration allerdings auf 400 mM NaCl erhöht, so war das Protein bei 30 °C ohne Tetracain bereits maximal stimuliert, so dass in diesem Fall eine Steigerung der Tetracainkonzentration keinen Effekt bewirkte bzw. der Tetracaineffekt durch die hohe Salzkonzentration verdeckt wurde. Wurde die Messtemperatur allerdings auf 10 °C erniedrigt, so zeigten sich unabhängig von den externen Salzkonzentrationen sowie unabhängig von der Tetracainkonzentration Aktivitäten von ca. 15 – 25 nmol/min*mg TG. Somit konnte das Lokalanästhetikum den Carrier bei 10 °C nicht stimulieren. Eine Erklärungsmöglichkeit für dieses Resultat könnte darin liegen, dass Tetracain grundsätzlich bei 10 °C nicht auf die Membran wirken kann. Weiterhin wäre es möglich, dass das Protein unter diesen Bedingungen bereits maximal aktiv war, sodass kein Einfluss des Lokalanästhetikums beobachtet werden konnte, weil der Tetracaineffekt durch die Kälteaktivierung verdeckt wurde. Schlussfolgernd repräsentiert die Aktivität von BetP bei

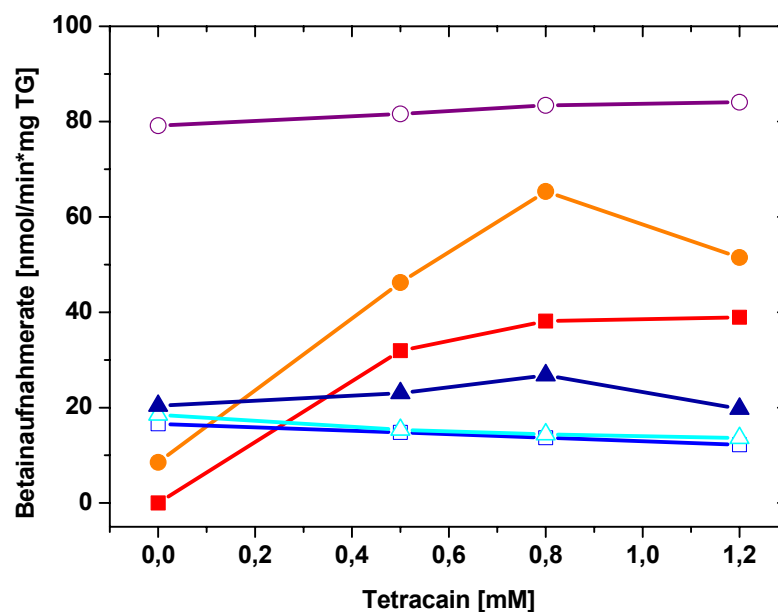


Abb. 12 Einfluss des Lokalanästhetikums Tetracain auf die Aktivität von BetP im Stamm *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T nach Kultivierung der Zellen bei 30 °C und Variation der Messtemperatur. Dargestellt ist die tetracainabhängige Glycinbetain-Aufnahmerate von BetP. Als Basispuffer diente 50 mM KP_i , pH 7,5. Die Messtemperatur betrug 30 °C, der externe Puffer enthielt 50 mM NaCl (geschlossene Quadrate), 100 mM NaCl (geschlossene Kreise), 400 mM NaCl (offene Kreise). Alternativ betrug die Messtemperatur 10 °C, der externe Puffer enthielt 50 mM NaCl (offene Quadrate), 100 mM NaCl (offene Dreiecke), 400 mM NaCl (geschlossene Dreiecke). Die Aufnahmemessung wurde durch Zugabe von 250 μ M ^{14}C -Glycinbetain gestartet.

Kältestress die maximal erreichbare Stimulierung, so dass weder die gleichzeitige osmotische Stimulierung noch die Zugabe von Tetracain einen additiven Effekt auf die Aktivität des Carriers ausüben.

3.5 Aktivierung der Cystein-freien BetP Variante C252T in Proteoliposomen

3.5.1 Osmoregulation der BetP Variante C252T in *E.coli*-Liposomen

Der Beweis, dass BetP osmosensorische Eigenschaften besitzt, konnte mit Hilfe des Proteoliposomensystems gezeigt werden. Dieses reduzierte System, das ausschließlich aus gereinigtem BetP und Liposomen besteht, eignet sich ideal, um sensorische Eigenschaften von Proteinen aufzuzeigen, da es die Variation sowohl der internen und externen Bedingungen, als auch der Membranumgebung erlaubt. Im rekonstituierten System ist die BetP Aktivität von der lumenalen K^+ -Konzentration abhängig (Rübenhagen *et al.*, 2001). Unter hyperosmotischen Bedingungen nimmt BetP eine durch den Wasserausstrom bedingte Erhöhung der internen Kaliumkonzentration wahr und wird daraufhin aktiviert. In dieser Arbeit sollte *in vitro* untersucht werden, ob BetP neben osmosensorischen Fähigkeiten auch als Kältesensor fungiert. Die Studien in dieser Arbeit wurden an einer Cystein-freien BetP-Variante durchgeführt, bei der Cystein an Position 252 in der fünften Transmembranhelix gegen ein Threonin ausgetauscht wurde. Diese BetP-Variante bietet den Vorteil, in zukünftigen Experimenten die Proteindynamik von BetP fluorezenzspektroskopisch zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass die Osmoregulation und das temperaturabhängige Aktivierungsprofil der Cystein-freien BetP-Mutante sowohl unter hoch- als auch unter niedrigosmotischen Bedingungen, in Übereinstimmung zum Wildtyp ist (Daten nicht gezeigt).

Das *betP* Gen wurde im Stamm DH5 α mcrcrbetP C252T überexprimiert. Nach anschließender Membranpräparation wurde das Protein über StrepTactin[®]-Affinitätschromatographie gereinigt sowie die Aufreinigung mit Hilfe von SDS-Page überprüft. Die Rekonstitution des Carriers erfolgte zunächst in *E.coli*-Liposomen (*E. coli Polar Lipid Extract*). Als Basispuffer wurde 100 mM KP_i , pH 7,5 (225 mosmol/kg) verwendet. Die erfolgreiche Rekonstitution von BetP wurde zunächst durch Messung der osmotischen Stimulierbarkeit überprüft. In Abb. 13 sind die Betain-Aufnahmeraten bei steigender externer Osmolalität dargestellt, die durch Zugabe von Sorbitol eingestellt wurde. Grundsätzlich wurden die aufgetragenen Aufnahmeraten in Proteoliposomen aus 3 - 5 Messungen durch Mittlung gewonnen. Erwartungsgemäß zeigte sich bei Zunahme der externen Osmolalität eine Steigerung der Aufnahmerate mit maximaler Aktivität bei 600 mosmol/kg von

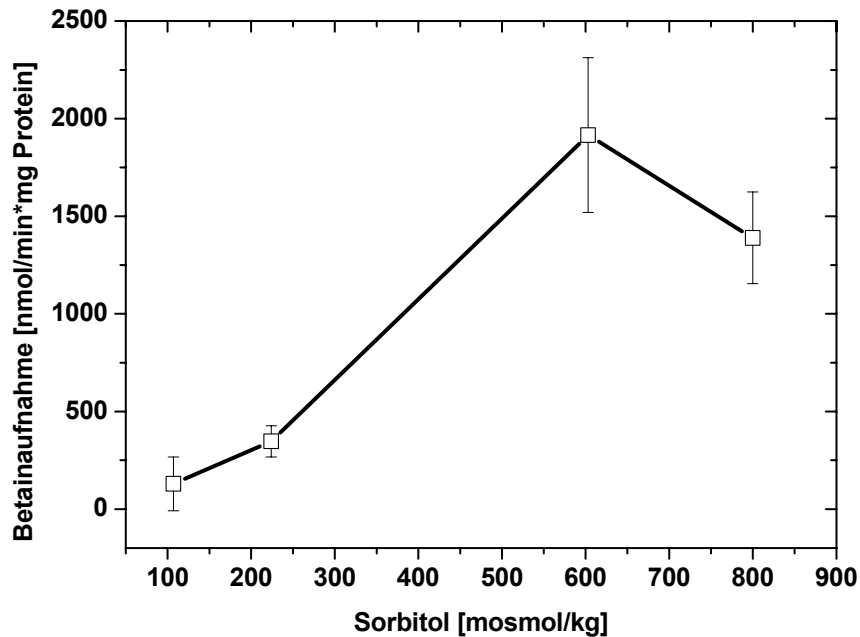


Abb. 13 Betainaufnahme von BetP C252T in *E. coli*-Liposomen bei steigender externer Osmolalität. Der interne Puffer enthielt 100 mM KP_i , pH 7,5 (225 mosmol/kg), der externer Puffer 50 mM NaP_i , pH 7,5. Die Osmolalität wurde durch Zugabe von Sorbitol eingestellt, Betain-Konzentration: 15 μ M.

ca. 2000 nmol/min*mg Protein. Somit konnte dieses *in vitro* System für die Untersuchung der Kälteaktivierung von BetP verwendet werden. Dabei wurde sowohl die externe Osmolalität als auch die Messtemperatur variiert. Die temperaturabhängige Betainaufnahme des Carriers BetP C252T in *E. coli*-Liposomen unter isoosmotischen (200 mosmol/kg) und hochosmotischen (600 mosmol/kg) Bedingungen ist in Abb. 14 dargestellt. Unter hochosmotischen wie auch unter isoosmotischen Bedingungen konnte bei Temperatursteigerung eine Zunahme der Aufnahme festgestellt werden. Somit ist bei Temperaturvariation ohne osmotische Stimulierung kein Optimum wie in *C. glutamicum* Zellen zu erkennen. Es lässt sich also aus diesen Ergebnissen schließen, dass der Carrier BetP C252T, rekonstituiert in *E. coli*-Liposomen, unter niedrig- bzw. isoosmotischen Bedingungen keine Kälteaktivierbarkeit zeigt.

Untersuchungen zur Kältestimulierung von BetP im heterologen *E. coli*-System zeigten ebenfalls einen Verlust der Kälteaktivierung unter niedrigosmotischen Bedingungen. Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass möglicherweise eine Interaktion mit einem zweiten Protein, das als Kältesensor fungiert, essentiell für eine Kälteaktivierung von BetP ist. Daneben ist es ebenfalls möglich, dass die veränderte Membrenumgebung in *E. coli* Zellen bzw. *E. coli*-Liposomen eine Aktivierung von BetP bei niedrigen Temperaturen verhindert.

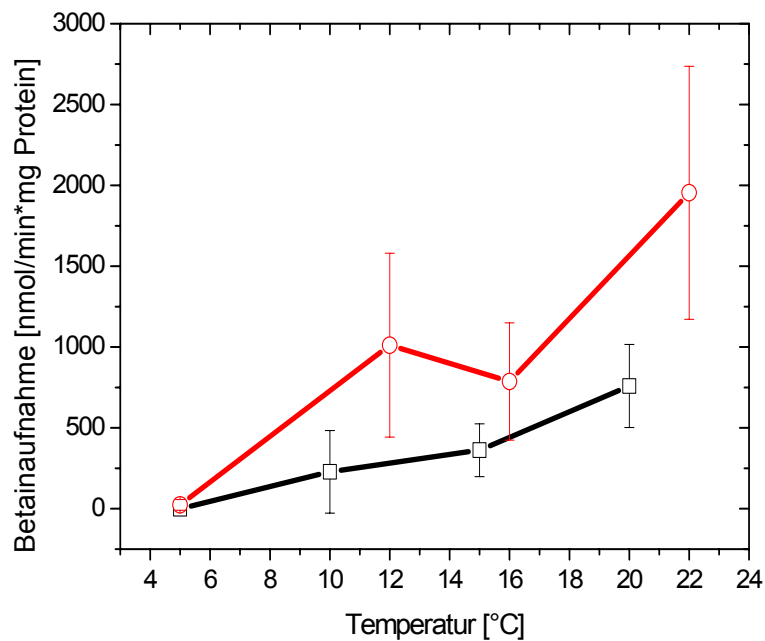


Abb. 14 Temperaturabhängige Betainaufnahme von BetP C252T in *E. coli*-Liposomen unter iso- (224 mosmol/kg) sowie unter hochosmotischen (1,2 osmol/kg) Bedingungen. Der interne Puffer enthielt 100 mM KP_i , pH 7,5 und hatte eine Osmolalität von 225 mosmol/kg. Der externe Puffer enthielt 50 mM NaP_i , pH 7,5 und hatte eine Osmolalität von 100 mosmol/kg. Höhere externe Osmolalitäten wurden durch Zugabe von Sorbitol eingestellt. Gezeigt ist die Aufnahmeaktivität von BetP unter niedrigosmotischen Bedingungen bei 204 mosmol/kg (Rechtecke) und unter hochosmotischen Bedingungen bei 603 mosmol/kg (Kreise). Betainkonzentration: 15 μ M.

3.5.2 Temperaturabhängige Aktivierungen der Cystein-freien BetP Variante C252T in DOPG fusionierten *E.coli*-Liposomen

Die Phospholipide in *E. coli* Zellen bestehen überwiegend aus Phosphatidylethanolamin (PE), während in *C. glutamicum* die Lipide Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylinositol (PI) und Cardiolipin mit jeweils ca. 33 % vorliegen (siehe Abschnitt 3.6). Es ist bereits nachgewiesen, dass die Aktivierungsschwelle von BetP bei osmotischem Stress von der Membrenumgebung moduliert wird. Eine Erhöhung des Anteils an PG in den *E. coli* Proteoliposomen führt zu einer Abnahme der Osmosensitivität, d.h. für eine osmotische Stimulierung sind höhere externe Osmolalitäten notwendig (Schiller *et al.* 2004). Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnte gezeigt werden, dass diese Verschiebung allein durch die Kopfgruppen der Phospholipide bzw. durch eine Erhöhung der negativen Ladung der Membranoberfläche bedingt ist. Falls die Membrenumgebung essentiell für die

Kälteaktivierung des Transporters ist, sollte es vielleicht möglich sein, Kältestimulierung nach Erhöhung des PG- Anteils in den Proteoliposomen zu detektieren.

Daher wurden temperaturabhängige Aufnahmemessungen des Carriers nach Fusion von 33 % DOPG zu den *E. coli*-Proteoliposomen durchgeführt. Aufgrund des durch die Membrenumgebung veränderten Aktivierungsprofils wurden Messpuffer mit höherer Osmolalität eingesetzt, d.h. als Basispuffer diente 50 mM NaP_i , pH 7,5; durch Sorbitolzugabe wurden externe Osmolalitäten von 224 mosmol/kg bis 1220 mosmol/kg eingestellt. Grundsätzlich gingen allen dargestellten temperaturabhängigen Aufnahmemessungen Überprüfungen der Osmostimulierung des Proteins voraus, um die Funktionsfähigkeit von BetP zu garantieren.

Abb. 15 zeigt die temperaturabhängige Betainaufnahme von BetP C252T mit 33 % DOPG-Anteil der Proteoliposomen bei unterschiedlichen externen Osmolalitäten. Bei Temperaturvariation unter isoosmotischen Bedingungen (200 mosmol/kg) wurde keine Aktivität des Transporters gemessen. Um zu überprüfen, ob eine mögliche Kälteaktivierung erst bei einer geringfügigen Steigerung der externen Osmolalität deutlich wird, wurde diese auf 400 mosmol/kg erhöht. Es zeigte sich bereits bei 5 °C eine Glycinbetain-Aufnahmerate von ca. 400 nmol/min*mg Protein, die bei weiterer Temperaturerhöhung unverändert blieb, und somit unter diesen Bedingungen keine Abhängigkeit der Proteinaktivität von der Temperatur vorlag. Bei einer weiteren Erhöhung der externen Osmolalität auf 600 mosmol/kg wurde bei 5 °C keine Transportaktivität gemessen, wohingegen bei 10 °C eine Aufnahmerate von ca. 1000 nmol/min*mg Protein detektiert wurde, die bei weiterer Temperaturzunahme auf nahezu gleichem Niveau blieb. Demgegenüber nahm die Transportaktivität unter hochosmotischen Bedingungen (1200 mosmol/kg) von 2,5 °C bis 9 °C geringfügig zu und erreichte bei weiterer Temperaturerhöhung auf 20 °C eine um den Faktor 4 höhere Rate mit ca. 2500 nmol/min*mg TG. Unter niedrigosmotischen Bedingungen war demnach keine Aktivität von BetP nach Fusion von 33 % DOPG nachweisbar, wohingegen bei osmotischer Stimulierung eine Abhängigkeit der Transportrate nach Arrhenius vorlag.

Zusammenfassend ist es möglich, Osmostimulierung von BetP nach Fusion von DOPG zu *E. coli*-Proteoliposomen zu erreichen, allerdings eignet sich dieses System nicht zum Nachweis der Kältestimulierung des Carriers. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Reizverarbeitung von osmotischem Stress und Kältestress durch unterschiedliche Weise erfolgt.

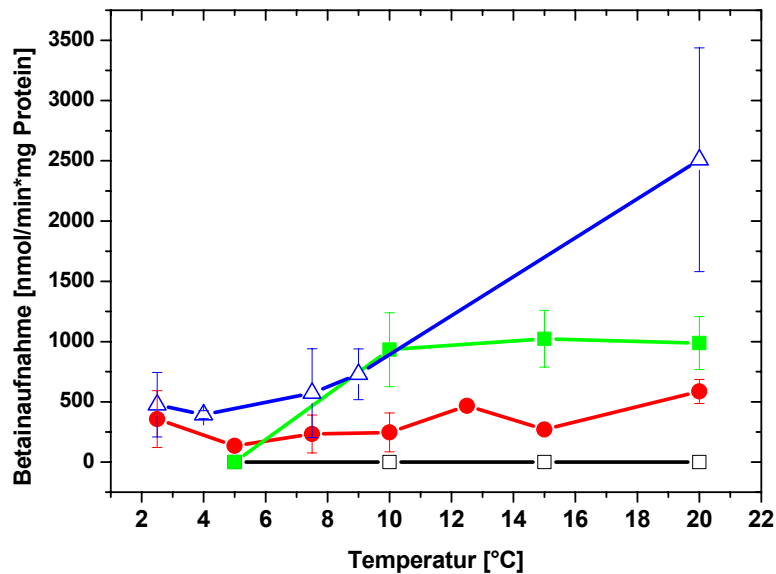


Abb. 15 Temperaturabhängige Betainaufnahme von BetP C252T in 33 % DOPG-fusionierten *E. coli*-Liposomen. Der interne Puffer enthielt 100 mM KP_i , pH 7,5 (225 mosmol/kg), der externe Basispuffer 50 mM NaP_i , pH 7,5. Die entsprechende Osmolalität wurde durch Zugabe von Sorbitol eingestellt: 200 mosmol/kg (offene Rechtecke), 400 mosmol/kg (Kreise), 600 mosmol/kg (geschlossene Rechtecke), 1220 mosmol/kg (Dreiecke). Betainkonzentration: 15 μ M.

3.5.3 Untersuchungen zur Osmoregulation und Kälteaktivierung der Cystein-freien BetP Variante C252T in *E. coli*-Liposomen mit variiertem Anteil an POPG

Es wurde bereits festgestellt, dass in *E. coli*-Liposomen rekonstituiertes BetP C252T mit dazu fusioniertem Dioleoylphosphatidylglycerol (DOPG, 33 % im Gesamtansatz) unter iso- bzw. niedrigosmotischen Bedingungen nicht kälteaktivierbar ist. Analysen der Fettsäurezusammensetzung zeigten bei 30 °C kultivierten Zellen ein Verhältnis von Palmitin- und Ölsäure von ca. 1:1 (s. Abschnitt 3.6). Um sicherzustellen, dass nicht der relativ hohe Anteil der Ölsäure in DOPG die Kälteaktivierung verhindert, wurde im folgenden POPG (33 % im Gesamtansatz) zu den Proteoliposomen fusioniert. Da bislang die Aktivität von BetP in POPG-haltigen Membranen nicht untersucht worden ist, wurde zunächst das Aktivierungsprofil des Transporters in Proteoliposomen mit 33 % POPG in Abhängigkeit von der externen Osmolalität bestimmt (Abb. 16A). Das Aktivierungsprofil zeigte nach Fusionieren von POPG und Variation der externen Osmolalität nicht einen sigmoiden Verlauf, sondern spiegelte sich in einer Optimumskurve wider. Die halbmaximale Aktivität wurde bereits unter isoosmotischen Bedingungen erreicht.

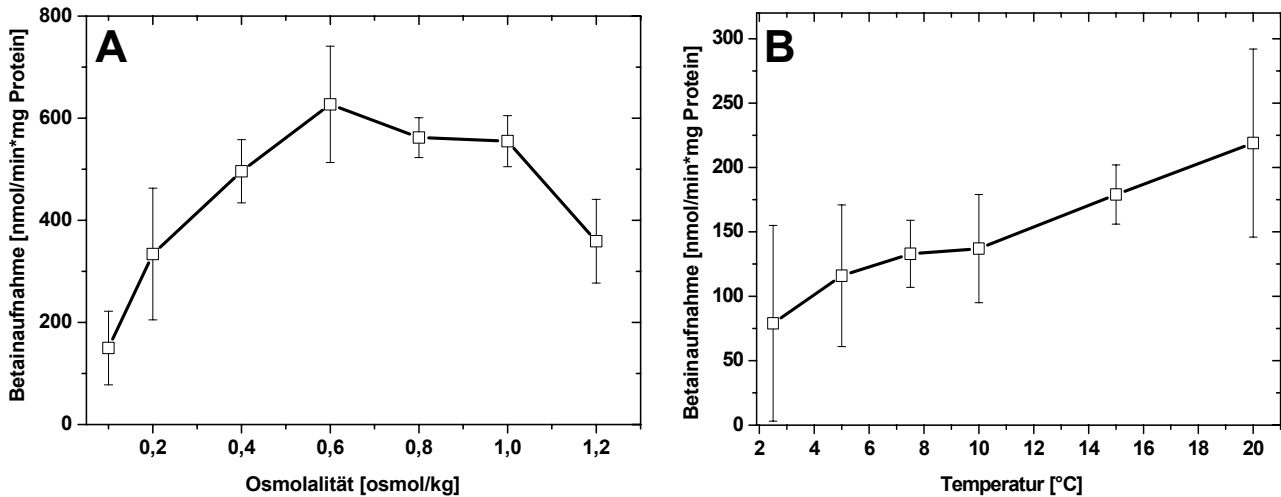


Abb. 16 Betainenaufnahme von BetP C252T in *E. coli*-Liposomen mit 33 % fusioniertem POPG-Anteil in Abhängigkeit von der Osmolalität und Temperatur. Der interne Puffer enthielt 100 mM KP_i , pH 7,5 (225 mosmol/kg), der externe Puffer enthielt 50 mM NaP_i , pH 7,5. Die externe Osmolalität wurde durch Prolin eingestellt. Betainenaufnahme von BetP in Abhängigkeit von der externen Osmolalität (A). Betainenaufnahme von BetP in Abhängigkeit von der Temperatur unter isoosmotischen Bedingungen (220 mosmol/kg). Betainkonzentration: 15 μ M.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Protein auch nach Fusion mit POPG osmoreguliert ist, wenngleich auch mit einem unterschiedlichen Aktivierungsprofil, wurden im Weiteren temperaturabhängige Aufnahmemessungen unter niedrig- bzw. isoosmotischen Bedingungen durchgeführt (Abb. 16B). Es zeigte sich erneut eine Temperaturabhängigkeit des Transports nach Arrhenius, d.h. auch durch Erhöhung des POPG Anteils wurde keine Kälteaktivierung des Carriers *in vitro* nachgewiesen. Vorausgesetzt, die Membrenumgebung ist verantwortlich für die Kälteaktivierung von BetP, so könnte ein möglicher Grund für das Ausbleiben der Kälteaktivierung in Proteoliposomen darin bestehen, dass durch Rekonstitution des Proteins in vorgeformte *E. coli*-Liposomen die Verhältnisse in *C. glutamicum* nicht in ausreichendem Maße simuliert werden können. Mögliche Gründe könnten sein, dass (i) der Einsatz der *E. coli*-Lipide grundsätzlich die Kälteaktivierung von BetP verhindert, (ii) ein exaktes Verhältnis der Fettsäuren Öl- und Palmitinsäure oder (iii) der Kopfgruppen PI, PG und Cardiolipin ausschlaggebend für eine Kälteaktivierung sind. Als Lösungsansatz sollten Lipide aus *C. glutamicum* herangezogen werden.

3.5.4 Temperaturabhängige Aktivierung von BetP C252T in *E. coli*-Liposomen mit variiertem Anteil an *C. glutamicum*-Liposomen

Um die Phospholipidumgebung in *C. glutamicum* möglichst identisch zu simulieren, sollte im Folgenden das Proteoliposomensystem durch den Einsatz von Lipiden, die aus *C. glutamicum* extrahiert wurden, optimiert werden. Bislang ist es noch nicht gelungen, aus *C. glutamicum* Phospholipiden dichte Liposomen zu generieren (R. Krämer, persönliche Mitteilung). Es wurde angenommen, dass dafür eine besondere Fettsäure-ähnliche Zellwandkomponente, die Mycolsäuren, verantwortlich ist. Da *C. glutamicum* ATCC13032 ein mycolsäurehaltiger Stamm ist, wurde für die Lipidextraktion die Mutante *C. glutamicum* ATCC13032 Δ otsA Δ treS Δ treY verwendet. Bedingt durch die Defizienz, Trehalose zu synthetisieren, zeichnet sich dieser Stamm dadurch aus, dass er nicht in der Lage ist, Mycolsäuren herzustellen (Wolf *et al.*, 2003; Tropis *et al.*, 2005; Tzvetkov *et al.*, 2003). Die aus dem mycolsäurefreien *C. glutamicum* Stamm extrahierten Lipide wurden von C.-J. Tsai, MPI Frankfurt, zur Verfügung gestellt. Da die Fusion von *C. glutamicum*-Liposomen zu *E. coli*-Lipid haltigen Proteoliposomen bekanntermaßen problematisch ist, wurde zunächst ein geringer Anteil von *C. glutamicum*-Lipiden fusioniert und die BetP Aktivität in Abhängigkeit von der externen Osmolalität überprüft (Abb. 17). Während bei 5 %

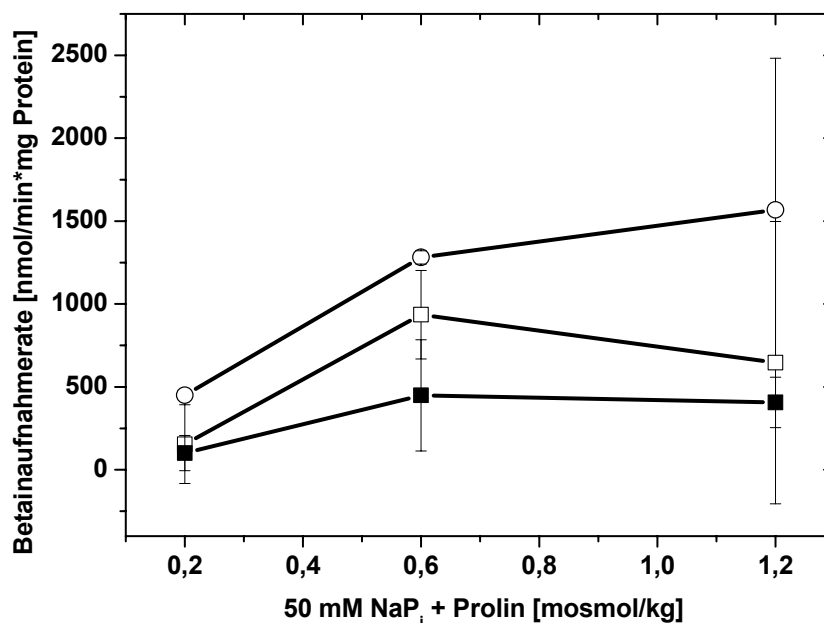


Abb. 17 Betainaufnahme von BetP C252T in *E. coli*-Liposomen mit unterschiedlichem Anteil an *C. glutamicum* Phospholipiden in Abhängigkeit der externen Osmolalität. 5 % *C. glutamicum*-Liposomen (Kreise), 10 % *C. glutamicum*-Liposomen (offene Rechtecke), 20 % *C. glutamicum*-Liposomen (geschlossene Rechtecke). Interner Puffer: 100 mM KP_i , pH 7,5 (225 mosmol/kg), Betainkonzentration: 15 μ M.

C. glutamicum-Liposomen eine Steigerung der Aufnahmerate mit zunehmender externer Osmolalität zu beobachten war, wurde nach Erhöhung des Anteils an *C. glutamicum*-Liposomen auf 10 und 20 % keine deutliche osmotische Stimulierbarkeit nachgewiesen. Ein möglicher Grund könnte darin liegen, dass die Fusion von *C. glutamicum*-Liposomen ionenpermeable Proteoliposomen zur Folge hat.

Trotz der Vermutung, dass *C. glutamicum*-Lipide zu ionenpermeablen Proteoliposomen führen, wurde die Konzentration dieser Lipide weiter erhöht, um auszuschließen, dass möglicherweise ein zu hoher Anteil der *E. coli*-Lipide eine Kälteaktivierung des Carriers inhibiert. Dass die Fähigkeit zur Osmoregulation durch eine Erhöhung des Anteils an *C. glutamicum*-Liposomen verstärkt eingeschränkt ist, wurde durch Fusionen mit bis zu 33 % und 66 % *C. glutamicum*-Liposomen (Endkonzentrationen) untermauert. Aktivitätsmessungen in Abhängigkeit von der externen Osmolalität zeigten, dass der Carrier nicht aktiv war (Daten nicht gezeigt). Als weitere Versuchsmodifizierung wurden neben *C. glutamicum*-Liposomen zusätzlich 33 % synthetisches DOPG zu den BetP-haltigen *E. coli*-Liposomen fusioniert. Erneut wurde keine deutliche osmotische Stimulierbarkeit nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend war es nicht möglich, die in *C. glutamicum* Zellen *in vivo* nachgewiesene Kälteaktivierung im reduzierten System *in vitro* zu zeigen. Dies könnte zum einen daran liegen, dass der Transporter unter diesen Bedingungen grundsätzlich nicht stimulierbar ist, da für eine Kälteaktivierung ein zweites Protein erforderlich ist, oder die Membranzusammensetzung von *C. glutamicum* nicht in ausreichendem Masse reproduziert werden konnte. Eine exakte Zusammensetzung der *C. glutamicum* Phospholipidumgebung aus synthetischen Lipiden konnte aus Kostengründen nicht erfolgen. Weiterhin könnte der Einsatz von Original *C. glutamicum*-Lipiden ungeeignet sein, um Liposomen herzustellen, da die Phospholipide bei der Extraktion eventuell oxidiert wurden. Möglicherweise könnte das Vorhandensein von Porinproteinen in den Lipidextrakten aus *C. glutamicum* ein Grund dafür sein, dass keine intakten Liposomen aus *C. glutamicum* Lipiden hergestellt werden konnten. Die Vermutung, dass allein die Mycolsäuren die Herstellung intakter Proteoliposomen verhindern könnten, wurde durch den Einsatz des mycolsäurefreien Stammes widerlegt. Eine mögliche Verunreinigung der *C. glutamicum*-Lipide durch Proteine konnte mit Hilfe von Amido-Black-Proteinbestimmungen ausgeschlossen werden.

3.6 Bestimmung der temperaturabhängigen Phospholipidzusammensetzung in *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T

Die Kälteaktivierung von BetP zeigte sich nicht im reduzierten *in vitro* Proteoliposomensystem. Mit dem Ziel eine weitere Methode zu etablieren, um den Einfluss der Membranumgebung auf die Kältestimulierung des Carriers zu untersuchen, sollten *C. glutamicum* Zellen an unterschiedliche Kultivierungstemperaturen adaptiert werden. Die Zusammensetzung der Phospholipide in Bakterien ist in hohem Maße von der Kultivierungstemperatur abhängig. Dabei sinkt die Membranfluidität in mesophilen Organismen mit abnehmender Kultivierungstemperatur. Um die Membranfluidität auch bei Kältestress aufrechterhalten zu können, reagieren zahlreiche Mikroorganismen mit einer signifikanten Erhöhung der Anzahl längererkettiger, ungesättigter Fettsäuren sowie in seltenen Fällen mit einer geringfügigen Änderung der Kopfgruppen der Phospholipide (Casadei *et al.*, 2002; Haque und Russell, 2004; Bakholidina *et al.*, 2004). Im Folgenden sollte der Frage nachgegangen werden, ob auch die Zusammensetzung der Phospholipide in *C. glutamicum* von der Kultivierungstemperatur abhängt. Sollte die Phospholipidzusammensetzung eine Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur aufweisen, so könnte durch die Kultivierung bei tiefen Temperaturen gezielt die Membranzusammensetzung manipuliert werden, um so einen möglichen Einfluss der Phospholipide auf das Regulationsverhalten von BetP bei der Kälteaktivierung aufzuzeigen. Mit Hilfe von GC Analysen (Zusammenarbeit mit A. Lipski, Universität Osnabrück) sowie LC-ESI-MS/MS-Analysen (Zusammenarbeit mit C. Ejsing, AG A. Shevchenko, MPI, Dresden) wurde die Phospholipidzusammensetzung in *C. glutamicum* in Abhängigkeit von der Wachstumstemperatur untersucht. Die Kultivierung der Zellen erfolgte gemäß den Aufarbeitungen für die Betain Aufnahmemessungen, da die Analysen genau die Zusammensetzung der Phospholipide zum Zeitpunkt der Aufnahmemessungen, d.h. in der spätexponentiellen Phase, widerspiegeln sollten. Dazu wurden Über-Nacht-Kulturen von *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T in BHI-Medium bei 30 °C angesetzt. Die Kultur wurde auf ca. OD₆₀₀ 1 mit vortemperiertem BHI-Medium überimpft. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei verschiedenen Temperaturen bis zu einer OD₆₀₀ 7,5-8, anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, Membranpräparationen sowie Lipidextraktionen durchgeführt. Die Quantifizierung der extrahierten Phospholipide erfolgte mit Hilfe der Phosphatveraschung (Daten nicht gezeigt). Die Analysen der Phospholipide erfolgten mit Hilfe von LC-ESI-MS/MS. Jede Bedingung wurde durch mindestens drei unabhängige Kultivierungen abgesichert. In Abb. 18 ist die temperaturabhängige Zusammensetzung der Fettsäuren in *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T dargestellt. Mit Ausnahme weniger Fettsäuren, die mit maximal ca. 2 % vorlagen, wurden bei allen untersuchten Temperaturen ausschließlich die beiden Fettsäuren Palmitin- und Ölsäure

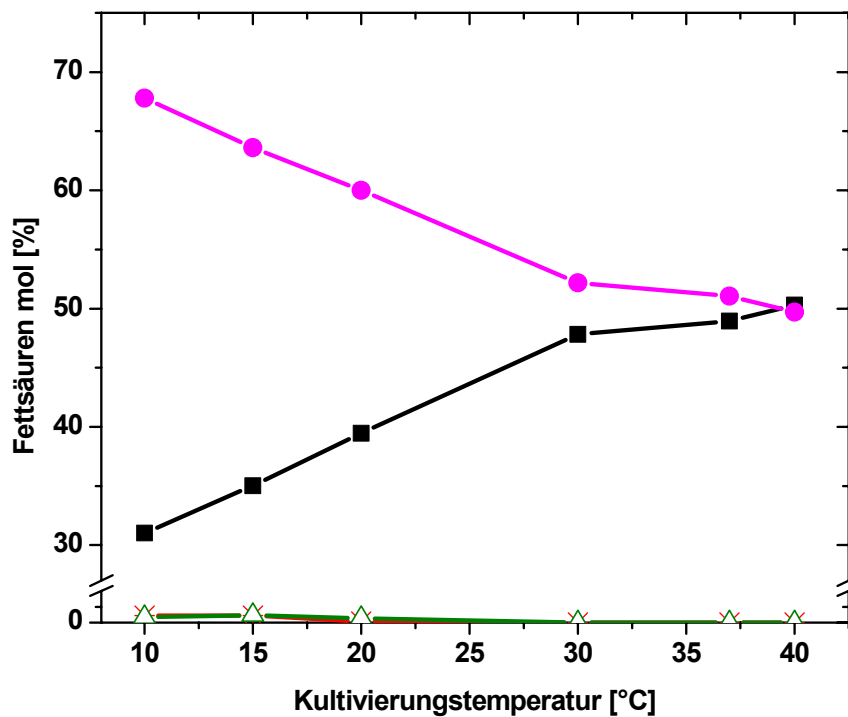


Abb. 18 Fettsäurezusammensetzung in *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen. Dargestellt ist die relative Fettsäurezusammensetzung in der spätexponentiellen Phase nach Kultivierung der Zellen bei verschiedenen Temperaturen von 10 - 40 °C. Palmitinsäure (16:0), (Rechtecke); Ölsäure (18:1), (Kreise); Stearinsäure (18:0); (Dreiecke); Palmitoleinsäure (16:1), (Kreuze).

nachgewiesen. Bei der optimalen Wachstumstemperatur von 30 °C lagen die Fettsäuren Palmitin- und Ölsäure mit gleichen Anteilen von ca. 50 % vor. Auch bei Zunahme der Kultivierungstemperatur auf 37 °C oder 40 °C blieb diese Verteilung der Fettsäuren bestehen. Im Gegensatz zur Temperaturerhöhung wurde bei Erniedrigung der Kultivierungstemperatur folgende Änderung beobachtet: Mit Abnahme der Kultivierungstemperatur sank der Anteil der Palmitinsäure deutlich ab, wohingegen die Konzentration der längerkettigen, ungesättigten Ölsäure signifikant zunahm. Bei 10 °C lag der Anteil der Palmitinsäure bei lediglich ca. 30 %, wohingegen die Ölsäure mit ca. 70 % dominierte. Somit zeigte sich, zwischen 10 °C und 30 °C, bei Erniedrigung der Wachstumstemperatur eine nahezu lineare Korrelation zwischen der Temperatur, bei der die Zellen kultiviert wurden, und der Zusammensetzung der Fettsäuren.

Neben der Verteilung der Fettsäuren wurde ebenfalls die temperaturabhängige Zusammensetzung der Kopfgruppen untersucht. Abbildung 19 zeigt die Kopfgruppenverteilung in *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T in Abhängigkeit von der

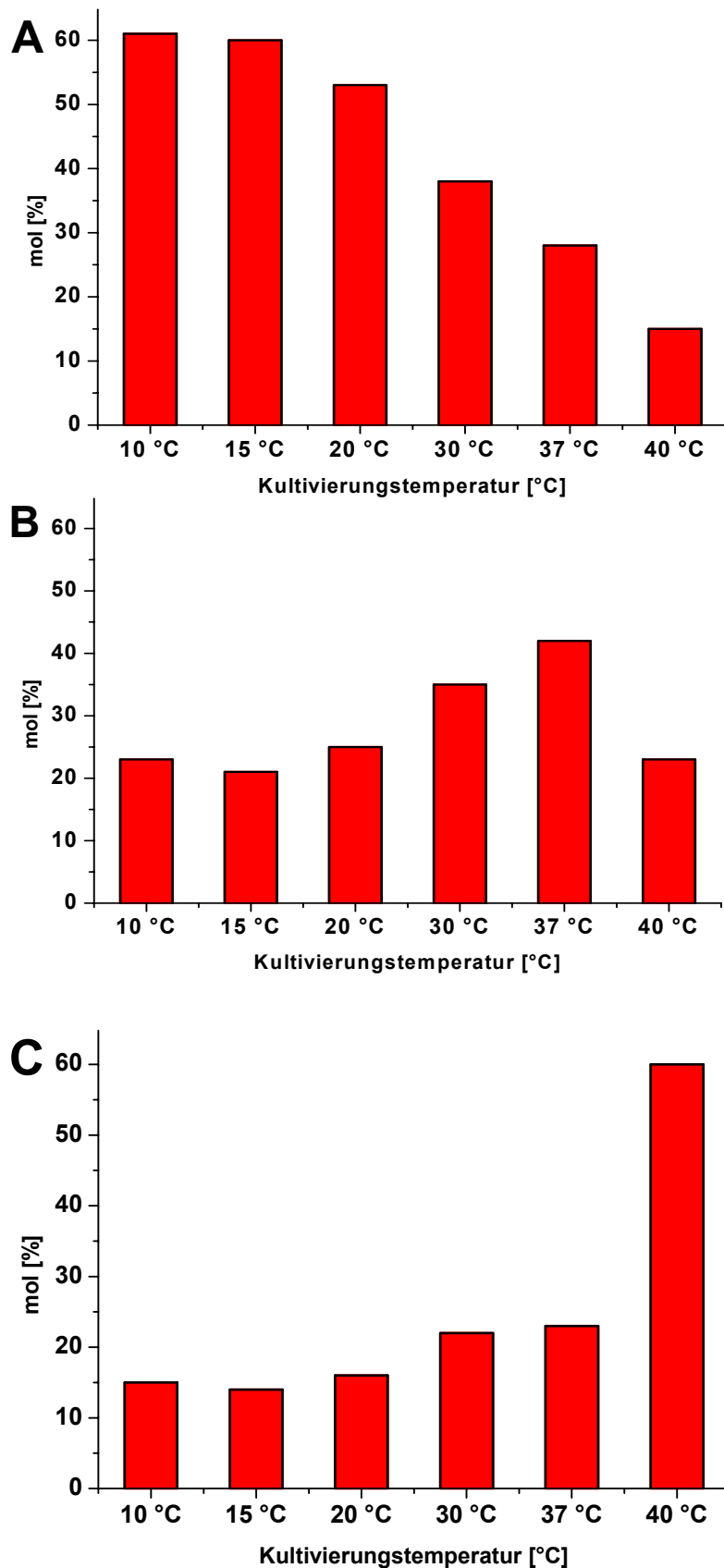


Abb. 19 Zusammensetzung der Kopfgruppen der Phospholipide in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur in *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T. Dargestellt ist die relative Phospholipidzusammensetzung der extrahierten Lipide in der spätexponentiellen Phase nach Kultivierung der Zellen bei verschiedenen Temperaturen von 10 °C - 40 °C. Phosphatidylglycerol (A), Phosphatidylinositol (B), Cardiolipin (C).

Kultivierungstemperatur. Als Hauptvertreter wurden Cardiolipin, Phosphatidylinositol und Phosphatidylglycerol nachgewiesen. Daneben wurden geringe Mengen anderer, nicht genauer charakterisierbare Phospholipide mit prozentualen Anteilen unterhalb von 10 % detektiert. Die Summe der Anteile der drei Hauptvertreter der Kopfgruppen wurde jeweils gleich 100 % gesetzt. Es zeigte sich ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen der Kultivierungstemperatur der Zellen sowie der Zusammensetzung der Kopfgruppen der Phospholipide. Bei Abnahme der Kultivierungstemperatur von 40 °C auf 10 °C sank der Anteil von Cardiolipin um den Faktor 4 von ca. 60 % auf ca. 15 %. Weiterhin zeigte sich eine Zunahme des Anteils des Phosphatidylglycerols bei Temperaturerniedrigung von ca. 15 % bei 40 °C bis auf 60 % bei 10 °C. Ein gegenläufiges Verhalten wurde bei der temperaturabhängigen Menge des Phospholipids Phosphatidylinositols deutlich. Bei Abnahme der Kultivierungstemperatur nahm der Anteil an PI von ca. 40 % bei 40 °C auf 22 % bei 12 °C ab.

Neben der separaten Analyse der Verteilung der Fettsäuren und der Kopfgruppen war es mit Hilfe der LC-ESI-MS/MS-Methode ebenfalls möglich, nachzuweisen, welche Fettsäuren mit welcher Kopfgruppe verbunden sind. Trotz der unterschiedlichen Verteilung der Fettsäuren in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung der Palmitin- und Ölsäure auf die drei Hauptvertreter der Kopfgruppen der Phospholipide.

3.7 Bestimmung der Phospholipidzusammensetzung in

***C. glutamicum* ATCC13032 nach Adaptation der Zellen an verschiedene Kultivierungstemperaturen**

Die in Abb. 20 dargestellte Phospholipidzusammensetzung von *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T nach Kultivierung bei 30 °C zeigte einen deutlichen Unterschied zu der bisher publizierten Verteilung der Phospholipide in *C. glutamicum* mit ca. 87 % PG, 5% Phosphatidylinositolmannosid., ca. 3% Phosphatidylinositol und ca. 1% Cardiolipin (Hoischen, 1990) Diese Daten wurden durch Analysen mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie ermittelt. Im Folgenden sollte geklärt werden, ob diese Zusammensetzung der Lipide in *C. glutamicum* eine Besonderheit des untersuchten BetP Überexpressionsstammes darstellt. Dazu wurden die Phospholipide des Wildtyps *C. glutamicum* ATCC13032 nach Kultivierung bei 10 °C, 30 °C sowie 40 °C im Vergleich zum zuvor dargestellten Überexpressionsstamm analysiert. In Abb. 27 sind die Ergebnisse aus jeweils drei unabhängigen Kultivierungen zusammengefasst. Aus dieser Darstellung wird deutlich, dass sowohl *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T als auch *C. glutamicum* ATCC13032 nach Kultivierung bei verschiedenen Temperaturen eine sehr

ähnliche Phospholipidzusammensetzung aufweisen. Damit stellt die Verteilung der Phospholipide keine Besonderheit des BetP Überexpressionsstammes dar. Ursachen für diese drastischen Unterschiede zwischen den früheren und neueren Ergebnissen könnten an unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen wie Medienzusammensetzungen liegen. Des Weiteren wäre es möglich, dass die vorherigen Untersuchungen, welche mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie durchgeführt wurden, grundsätzlich ungenauer sind. Alternativ wurde der hohe Anteil an Cardiolipin möglicherweise bei der Lipidextraktion für die Dünnschichtchromatographie zu PG abgebaut, so dass daher nur marginale Mengen chromatographisch nachgewiesen werden konnten.

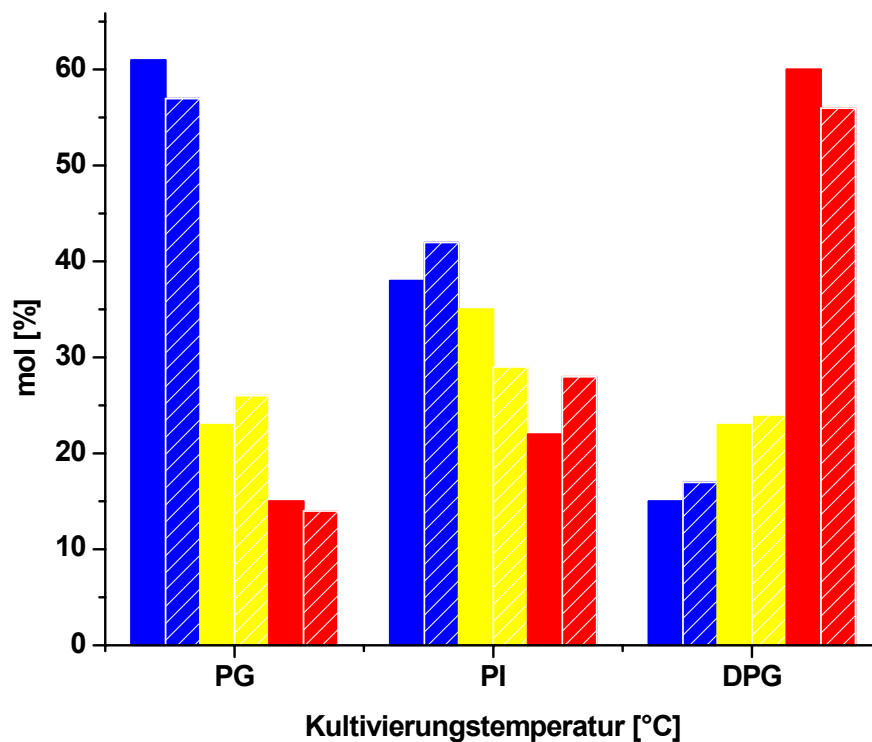


Abb. 20 Zusammensetzung der Kopfgruppen der Phospholipide in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur in *C. glutamicum* ATCC13032 (wt) im Vergleich zu *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T. Dargestellt ist die relative Phospholipidzusammensetzung der extrahierten Lipide in der spätexponentiellen Phase nach Kultivierung der Zellen bei verschiedenen Temperaturen von 10 °C - 40 °C. *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T nach Kultivierung bei 10 °C (blaue Säulen), 30 °C (gelbe Säulen), 40 °C (rote Säulen) sowie *C. glutamicum* ATCC13032 (wt) nach Kultivierung bei 10 °C (gestrichelte, blaue Säulen), 30 °C (gestrichelte, gelbe Säulen), 40 °C (gestrichelte, rote Säulen).

3.8 Kältereulation von BetP nach Adaptation von *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T an verschiedene Temperaturen

Untersuchungen zur Kälteaktivierung von BetP betrafen bisher die akute Stressantwort des Carriers auf tiefe Temperaturen, da die Kultivierungstemperatur der Zellen für alle Aufnahmemessungen 30 °C betrug. Die Kälteaktivierung wurde bereits nach 3 minütiger Inkubation bei tiefen Temperaturen und innerhalb weniger Sekunden nach Substratzugabe quantifiziert. Wie in Abschnitt 3.6 gezeigt wurde, führt die Kultivierung von *C. glutamicum* bei verschiedenen Temperaturen zu signifikanten Änderungen der Membranzusammensetzung. Adaptationen der Membranen wurden sowohl bei der Verteilung der Fettsäuren als auch der Kopfgruppen der Phospholipide nachgewiesen. Um mögliche Auswirkungen der Änderungen der Membranzusammensetzung auf die Kälteaktivierung von BetP zu untersuchen, wurden die Zellen in den folgenden Experimenten zwischen 10 °C und 40 °C kultiviert. Dazu wurde der Stamm *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T zunächst in BHI-Medium angezogen. Ein Aliquot der Zellen wurde anschließend auf eine OD_{600} 1 in BHI-Medium überimpft und bei der entsprechenden Temperatur bis zur spätexponentiellen Phase (OD_{600} von 8) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, in Puffer gewaschen, mit Glukose energetisiert und bis zu den Betain- Aufnahmemessungen auf Eis gelagert. Während der folgenden Aktivitätsmessungen wurden die an unterschiedliche Kultivierungstemperaturen adaptierten Zellen erneut für 3 Minuten unterschiedlichen Messtemperaturen ausgesetzt. Transportmessungen von Zellen, die bei 12 °C gewachsen waren, zeigten unter hochosmotischen Pufferbedingungen eine Zunahme der Aufnahmerate mit steigender Temperatur und mit einer maximalen Aktivität bei 30 °C mit ca. 70 nmol/min*mg TG (Abb. 21). Dieses Aktivierungsprofil ist somit durch ein Verhalten gemäß Arrhenius gekennzeichnet, so dass die Kälteadaptation im Vergleich zu 30 °C kultivierten Zellen keinen Effekt auf die temperaturabhängige Regulation von BetP bei gleichzeitiger osmotischer Stimulierung aufweist. Im Gegensatz dazu zeigte sich unter niedrigosmotischen Bedingungen folgendes Ergebnis: Nach Kultivierung der Zellen bei 12 °C war unter niedrigosmotischen Bedingungen und bei allen gemessenen Temperaturen keine Aktivierung des Carriers möglich. Dies bedeutet, dass Kälteadaptation der Zellen einen Verlust der Kälteaktivierung von BetP unter niedrigosmotischen Bedingungen zur Folge hat.

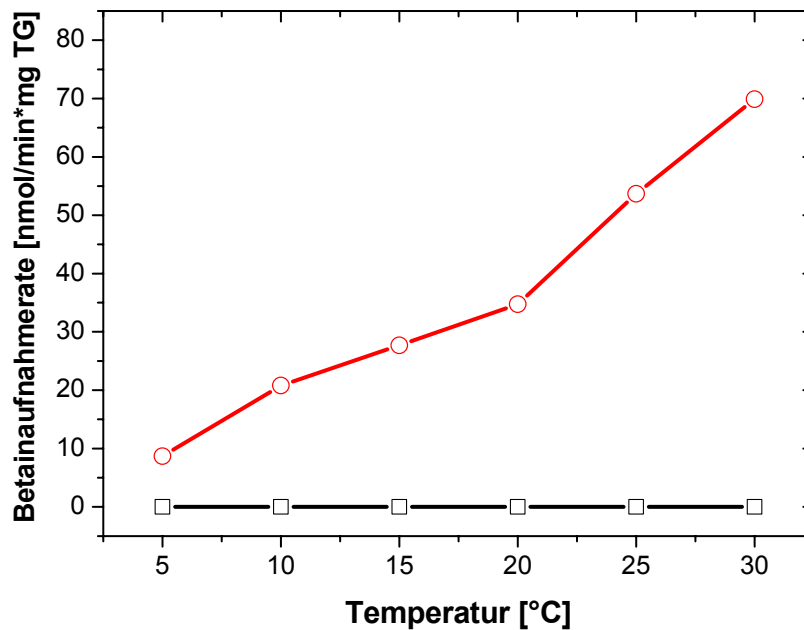


Abb. 21 Temperaturabhängige Aktivierung von BetP im Stamm *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T nach Kälteadaptation

Glycinbetain-Aufnahmerate von BetP bei variierender Temperatur unter niedrigosmotischen und hochosmotischen Bedingungen nach Kultivierung der Zellen bei 12 °C. Als Messpuffer dienten 50 mM KP_i , 50 mM NaCl, pH 7,5 (Rechtecke) sowie 50 mM KP_i , 600 mM NaCl, pH 7,5 (Kreise). Die Aufnahmemessung wurde durch Zugabe von 250 μM ^{14}C -Glycinbetain gestartet.

An dieser Stelle sollte die Frage geklärt werden, ob die Stärke des Kältestresses während des Wachstums und die Verschiebung der Kennkurve auf eine fein abgestimmte und graduelle Weise erfolgt. Dazu wurden die Zellen bei weiteren Temperaturen kultiviert. Grundsätzlich zeigten alle temperaturabhängigen Betain- Aufnahmemessungen, unabhängig von der Kultivierungstemperatur, bei gleichzeitiger osmotischer Stimulierung eine Zunahme der Aktivität mit steigender Temperatur, d.h. eine Arrhenius Beziehung (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend ist die temperaturabhängige Aktivität von BetP nach Adaptation an 12, 21, 30, 37 und 40 °C bei einer externen Osmolalität von 200 mosmol/kg in Abb. 22 dargestellt. Während sich bei der optimalen Wachstumstemperatur eine deutliche Kälteaktivierbarkeit des Carriers zeigte, nahm diese mit Abnahme der Wachstumstemperatur auf 21 °C um ca. 50 % ab. Eine weitere Absenkung der Wachstumstemperatur auf 12 °C hatte sogar, wie bereits in Abb. 21 beschrieben, einen Verlust der Kälteaktivierung zur Folge. Zusammenfassend bestand eine deutliche Korrelation zwischen der kultivierungstemperaturabhängigen Phospholipidzusammensetzung der Zellen und der Regulation von BetP unter niedrigosmotischen Bedingungen in Abhängigkeit von der Messtemperatur.

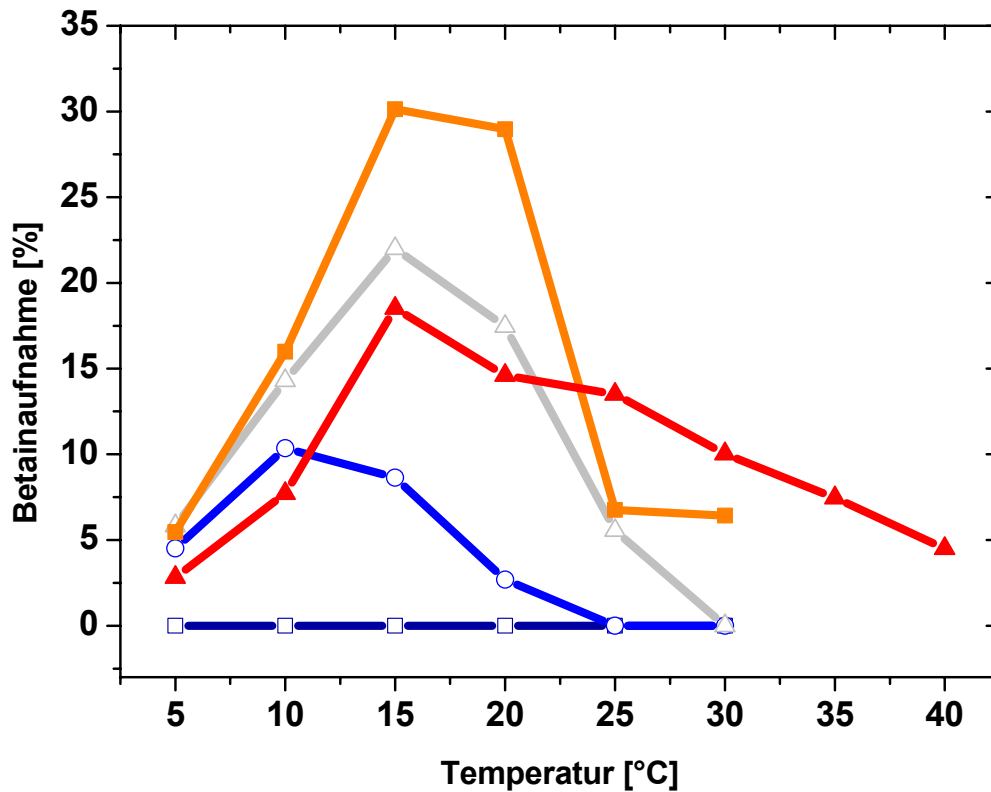


Abb. 22 Aktivität von BetP im Stamm *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T in Abhängigkeit von der Wachstumstemperatur bei 200 mosmol/kg. Adaptation an 12 °C (Quadrate), 21 °C (Kreise), 30 °C (offene Dreiecke), 37 °C (geschlossene Rechtecke), 40 °C (geschlossene Dreiecke). Als Basispuffer wurde 50 mM KP_i , pH 7,5, 50 mM NaCl verwendet. Der externe Puffer enthielt mM KP_i , pH 7,5, 50 mM NaCl. Die Aufnahmemessung wurde durch Zugabe von 250 μ M ^{14}C -Glycinbetain gestartet.

Weitere protektive Eigenschaften kompatibler Solute, die bereits bei Schwankungen der Osmolalität oder Kältestress nachgewiesen werden konnten, wurden ebenfalls bei Hitzestress dokumentiert. Daher wurde, neben der Untersuchung des Einflusses der Kälteadaptation auf die Kälteaktivierung von BetP, durch weitere Experimente die temperaturabhängige BetP Aktivierung nach Adaptation der Zellen an Hitzestress untersucht. Bei einer Wachstumstemperatur von 37 °C ist keine deutliche Einschränkung der Wachstumsrate zu beobachten, wohingegen eine weitere Erhöhung der Kultivierungstemperatur um 3 °C auf 40 °C die Toleranzgrenze für *C. glutamicum* darstellt. Somit ist das Bodenbakterium, neben der bedeutenden Toleranz gegenüber Kältestress, nicht in der Lage, ausgehend von der optimalen Wachstumstemperatur von 30 °C, einen Temperaturanstieg von mehr als 10 °C zu überleben.

Nach Kultivierung der Zellen bei 37 °C konnte eine deutliche Kälteaktivierung bei einer Messtemperatur von 15 °C nachgewiesen werden. Die Optimumskurve zeigte einen sehr ähnlichen Verlauf wie unter Kontrollbedingungen, d.h. nach Kultivierung der Zellen bei 30 °C. Unterschiede zeigten sich ausschließlich durch deutlich höhere Aufnahmezeiten nach Adaptation an 37 °C. Zellen, die bei 40 °C kultiviert wurden, zeigten in Transportmessungen, d.h. bei einer plötzlichen Variation der Umgebungstemperatur zwischen 5 °C bis 40 °C, eine deutliche Kälteaktivierung von BetP. Im Gegensatz zu den übrigen Aufnahmeprofilen führte der extreme Hitzestress, neben einer leichten Abnahme der Aufnahmezeiten bei niedrigen Temperaturen, zu einer starken Verbreiterung der Aktivierungskurve. Während bei allen bisher untersuchten Wachstumstemperaturen unter niedrigosmotischen Bedingungen bei 30 °C kaum Aktivität nachgewiesen wurde, betrug die Aufnahmezeit nach Adaptation der Zellen an 40 °C bei der Messtemperatur von 30 °C über 50 % des Maximalwertes.

Zusammenfassend zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Kultivierungstemperatur von *C. glutamicum* und der Kälteaktivierung des Carriers BetP unter niedrigosmotischen Bedingungen. Je nachdem, bei welcher Temperatur die Zellen kultiviert wurden, resultierte ein unterschiedliches Regulationsverhalten bei der Betainaufnahme des Carriers. Dabei zeigte der Vergleich der maximalen Transportraten, in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur, folgenden graduellen Zusammenhang: Je höher die Wachstumstemperatur lag, desto höhere Aufnahmezeiten wurden erzielt. Eine Ausnahme dabei bildeten Zellen, die bei 40 °C kultiviert wurden.

Alle Maxima der Kälteaktivierung nach Kultivierung bei 30, 37 und 40 °C bei einer Messtemperatur von 15 °C (Abb. 23). Einzige Ausnahme stellte die Kultivierung bei 21 °C mit einer maximalen Kälteaktivierung bei 10 °C dar.

Zusammenfassend hat die Kultivierungstemperatur von *C. glutamicum* nicht nur Einfluss auf die Phospholipidverteilung, sondern darüber hinaus auf das temperaturabhängige Regulationsverhalten des Carriers BetP.

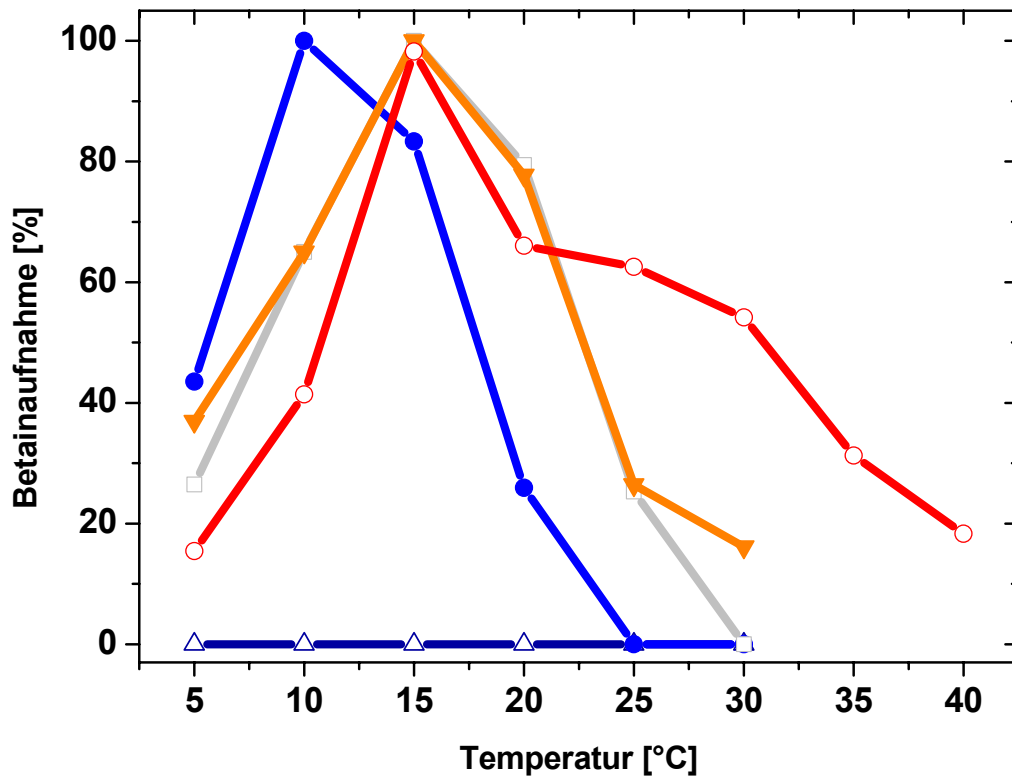


Abb. 23 Aktivität von BetP im Stamm *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T in Abhängigkeit von der Wachstumstemperatur bei 200 mosmol/kg. Die innerhalb einer Messung erreichte maximale Aufnahmerate wurde gleich 100 % sowie die übrigen Werte in Relation dazu gesetzt. Adaptation an 12 °C (offene Dreiecke), 21 °C (geschlossene Kreise), 30 °C (Rechtecke), 37 °C (geschlossene Dreiecke), 40 °C (offene Kreise). Als Basispuffer wurde 50 mM KP_i , pH 7,5, 50 mM NaCl verwendet. Die Aufnahmemessung wurde durch Zugabe von 250 μ M ^{14}C -Glycinbetain gestartet.

3.9 Osmoregulation von BetP nach Adaptation von *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T an verschiedene Kultivierungstemperaturen

Es wurde bereits nachgewiesen, dass die Kältereulation des Carriers BetP in hohem Maße von der Kultivierungstemperatur beeinflusst wird. Daher sollte nun geklärt werden, ob ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Kultivierungstemperatur und der Osmoregulation des Transportsystems besteht. Dazu wurde *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T analog zu den temperaturabhängigen Aufnahmemessungen kultiviert und präpariert (vgl. Abschnitt 3.2). Die im Folgenden dargestellten Aufnahmemessungen in Abhängigkeit zur externen Osmolalität wurden bei einer konstanten Messtemperatur von 30 °C durchgeführt.

Nach Kultivierung der Zellen bei der optimalen Wachstumstemperatur von 30 °C zeigte sich die bereits bekannte Kennkurve (Abb. 24). Bei Erhöhung der Kultivierungstemperatur auf 37 °C konnte kein deutlicher Unterschied zu den Kontrollbedingungen festgestellt werden. Demgegenüber führte die Hitzeadaptation durch Anzucht bei 40 °C zu einer deutlichen Verschiebung des Aktivierungsprofils. Nach diesem Hitzestress zeigte BetP eine im Vergleich zu den Kontrollbedingungen verstärkte Sensibilität gegenüber osmotischem Stress. Wurden die Zellen demgegenüber unterhalb der optimalen Wachstumstemperatur inkubiert, so zeigte sich ein gegensätzliches Verhalten. Nach Adaptation der Zellen an 21 °C nahm die Sensitivität gegenüber osmotischem Stress deutlich ab. Die Abnahme der Osmosensitivität mit abnehmender Kultivierungstemperatur konnte durch einen drastischeren Kältestress durch Adaptation an 12 °C weiter verstärkt werden. Die Verschiebung der Osmosensitivität von BetP in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur wird besonders deutlich, wenn, wie Abb. 25 zeigt, die Osmolalität, bei der die halbmaximale Aktivität erreicht wird, gegen die Kultivierungstemperatur

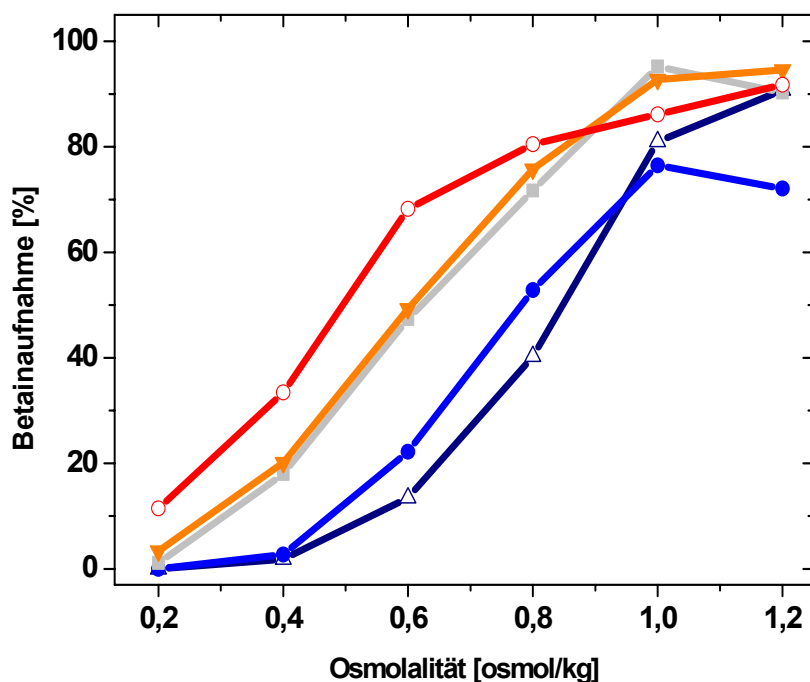


Abb. 24 Aktivität von BetP im Stamm *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T in Abhängigkeit von der externen Osmolalität nach Kultivierung bei verschiedenen Temperaturen. Die innerhalb einer Messreihe erreichte höchste Aufnahmerate wurde gleich 100 % und die übrigen Werte in Relation dazu gesetzt. Als Basispuffer wurde 50 mM KP_i , pH 7,5, 50 mM NaCl verwendet. Die entsprechenden Osmolalitäten wurden durch Zugabe von NaCl eingestellt. Adaptation an 12 °C (offene Dreiecke), 21 °C (geschlossene Kreise), 30 °C (Rechtecke), 37 °C (geschlossene Dreiecke), 40 °C (offene Kreise). Die Aufnahmemessung wurde durch Zugabe von 250 μ M ^{14}C -Glycinbetain gestartet.

aufgetragen wird. Während die halbmaximale Aufnahmegeschwindigkeit nach Kultivierung bei 12 °C bei einer externen Osmolalität von 0,85 osmol/kg erreicht wird, ist nach Hitzeadaptation bei 40 °C eine osmotische Stimulierung durch lediglich 0,5 osmol/kg notwendig. Es zeigte sich somit eine fast lineare Reduzierung der Osmosensitivität mit Abnahme der Kultivierungstemperatur. Zusammenfassend konnte ein sehr deutlicher Zusammenhang zwischen der kultivierungstemperaturabhängigen Phospholipidzusammensetzung in *C. glutamicum* und der Osmoregulation von BetP nach Adaptation an unterschiedliche Kultivierungstemperaturen nachwiesen werden.

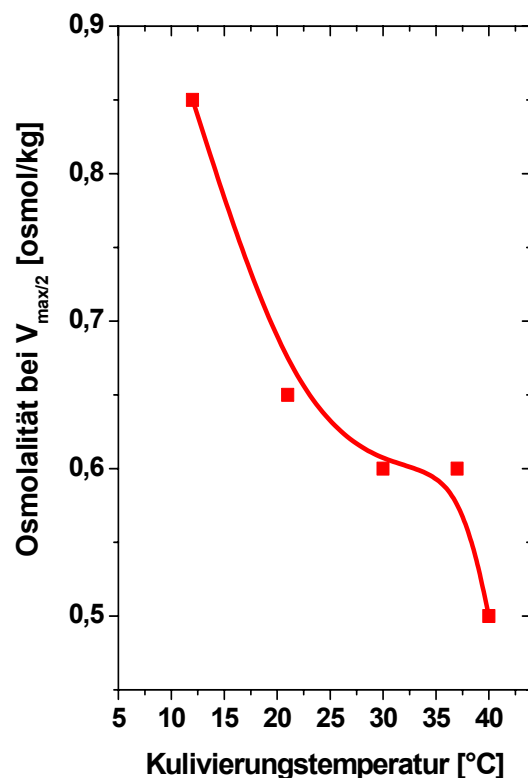


Abb. 25 Abhängigkeit der Osmosensitivität von BetP von der Kultivierungstemperatur. Dargestellt ist die temperaturabhängige Osmolalität, bei der die halbmaximale Geschwindigkeit erreicht wird. Die Daten wurden aus Abb. 24 ermittelt.

3.10 Kälteaktivierung von BetP in *C. glutamicum* DHPF pXMJ19 betP C252T nach Kälteadaptation

Die Kultivierung von *C. glutamicum* DHPF pXMJ19 BetP C252T bei 12 °C führte zum Verlust der Kälteaktivierung bei einer externen Osmolalität von 200 mosmol/kg. Das war jedoch nicht die einzige Änderung. Der Vergleich der Aktivierungsprofile in Abhängigkeit von der Osmolalität nach Inkubation der Zellen bei 12 °C sowie bei 30 °C zeigte eine signifikante

Abhängigkeit der Osmosensitivität von der Wachstumstemperatur. So war der Transporter nach Kälteadaptation der Zellen gegenüber osmotischem Stress weniger sensitiv bzw. erst bei höheren Osmolalitäten aktiv. Möglicherweise lag dies daran, dass die Kältestimulierung nach Kälteadaptation ebenfalls insensitiver geworden war. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in den folgenden Transportmessungen die Osmolalität der Messpuffer von 0,2 osmol/kg auf 0,4 und 0,6 osmol/kg erhöht. Durch diese geringfügige Erhöhung der Osmolalität wurde eine leichte Voraktivierung des Transporters gewährleistet, die jedoch nicht ausreichend für eine ausschließlich osmotische Stimulierung war.

In kälteadaptierten Zellen konnte durch geringfügige Erhöhung der Osmolalität erneut Kälteaktivierung nachgewiesen werden (Abb. 26). In beiden Fällen war eine deutliche Kälteaktivierung des Carriers zu beobachten, das Optimum lag zwischen 10 °C und 20 °C. Es konnte abgesichert werden, dass der Verlust der Kälteaktivierung von BetP nach Kälteadaptation der Zellen bei 200 mosmol/kg durch geringfügige Erhöhung der Osmolalität der Messpuffer aufgehoben werden konnte.

Somit wurde erneut ein entscheidender Einfluss der kultivierungstemperaturabhängigen Phospholipidzusammensetzung auf die Osmoregulation und das temperaturabhängige Aktivierungsprofil von BetP nach Adaptation an unterschiedliche Temperaturen deutlich.

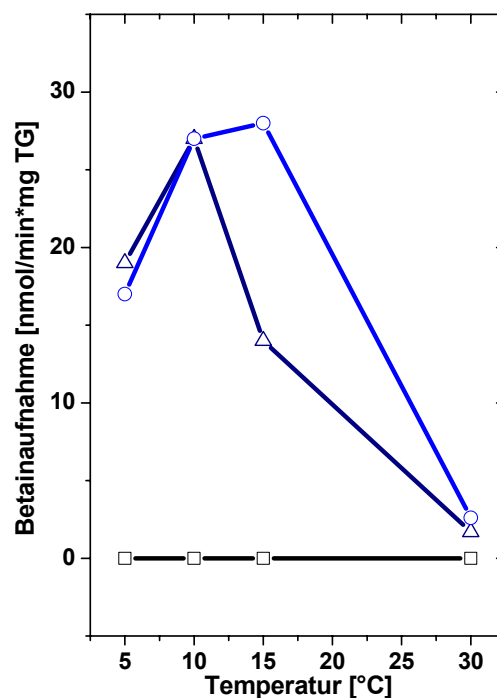


Abb. 26 Temperaturabhängige Aktivierung von BetP im Stamm *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T nach Kälteadaptation. Die Zellen wurden bei 12 °C inkubiert, als externer Puffer wurde 50 mM KP_i pH 7,5, mit NaCl verwendet, 200 mosmol/kg (Quadrate), 400 mosmol/kg (Dreiecke), 600 mosmol/kg (Kreise). Die Aufnahmemessung wurde durch Zugabe von 250 μ M ^{14}C -Glycinbetain gestartet.

3.11 Einfluss der Osmoadaptation auf die Osmoregulation und temperaturabhängige Aktivierung von BetP in *C. glutamicum* DHPF pXMJ19 betP C252T

Es wurde bereits ein deutlicher Einfluss der Kultivierungstemperatur sowohl auf die Osmoregulation als auch auf die Kälteaktivierung von BetP in *C. glutamicum* DHPF pXMJ19 betP C252T nachgewiesen. Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, ob ebenfalls die Adaptation an sehr hohe externe Osmolalitäten einen Einfluss auf das Aktivierungsprofil von BetP ausübt. Die Zellen wurden in BHI-Medium mit 750 mM NaCl bei 30 °C kultiviert. Die Betainaufnahme des Transporters bei Variation der externen Osmolalität nach Osmoadaptation ist in Abb. 27 dargestellt. Als Vergleich dient das Aktivierungsprofil von BetP nach Kultivierung bei 30 °C. Nach Salzadaptation wurde eine geringfügige Abnahme der Osmosensitivität des Proteins nachgewiesen. Die externe Osmolalität, bei der die halbmaximale Aufnahmerate nach Osmoadaptation im Vergleich zu den Kontrollbedingungen (30 °C adaptiert, ohne Osmoadaptation) erreicht wurde, verschob sich lediglich von 0,6 auf 0,65 osmol/kg. Somit fiel die Reduktion der Salzsensitivität insbesondere im Vergleich zu 12 °C adaptierten Zellen nicht signifikant aus.

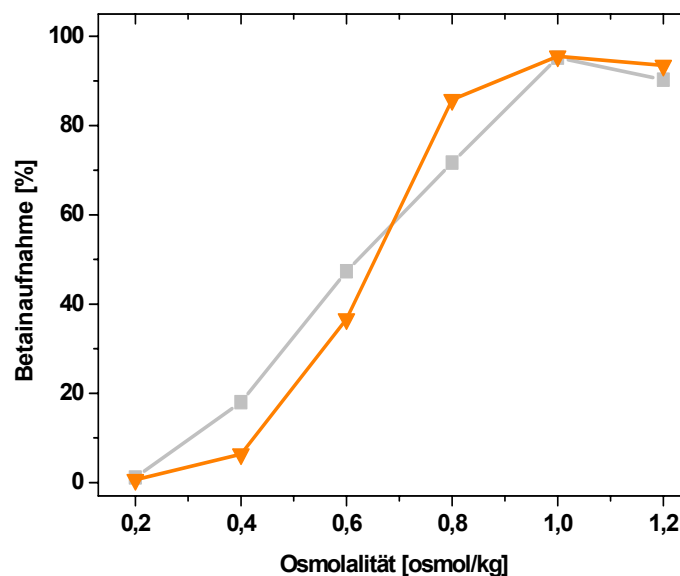


Abb. 27 Aktivität von BetP im Stamm *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T in Abhängigkeit von der externen Osmolalität nach Kultivierung unter niedrig- und hochosmotischen Bedingungen. Die innerhalb einer Messreihe erreichte höchste Aufnahmerate wurde gleich 100 % und die übrigen Werte in Relation dazu gesetzt. Als Basispuffer wurde 50 mM KP_i , pH 7,5, 50 mM NaCl verwendet. Die entsprechenden Osmolalitäten wurden durch Zugabe von NaCl eingestellt. Adaptation an 30 °C unter niedrigosmotischen Bedingungen (Rechtecke), sowie Adaptation an 30 °C unter hochosmotischen Bedingungen durch 750 mM NaCl (Dreiecke). Die Aufnahmemessung wurde durch Zugabe von 250 μ M ^{14}C -Glycinbetain gestartet.

In Abb. 28 ist die temperaturabhängige Betainaufnahme des Carriers nach Osmoadaptation dargestellt. Zellen, die an hohe Salzkonzentrationen im Medium angepasst waren, zeigten in Transportmessungen unter niedrigosmotischen Bedingungen (200 mosmol/kg) weiterhin eine Aktivierung von BetP durch tiefe Temperaturen. Allerdings fiel diese im Vergleich zu den Kontrollbedingungen deutlich geringer aus. Aufgrund der Tatsache, dass das Aktivierungsprofil in Abhängigkeit zur Osmolalität eine leichte Verringerung der Sensitivität nach Salzadaptation aufwies, stellte sich auch hier die Frage, ob während temperaturabhängiger Aufnahmemessungen salzadaptierter Zellen durch eine leichte Erhöhung der Osmolalität von 0,2 auf 0,4 osmol/kg der Effekt der Kälteaktivierung verstärkt werden kann. Wie in Abb. 28 dargestellt, führte die geringe Erhöhung der Salzkonzentration zu einer verstärkten Kälteaktivierung nach Salzadaptation.

Zusammenfassend konnte folgende Korrelation nachgewiesen werden: Osmoadaptation von *C. glutamicum* beeinflusst sowohl die Osmoregulation als auch die Kältereulation von BetP. Dabei führt Salzadaptation der Zellen zu einer leichten Abnahme der Salzsensitivität und ebenfalls zu einer Abnahme der Kälteaktivierung von BetP bei einer externen Osmolalität von 0,2 osmol/kg. Durch geringfügige Erhöhung der Osmolalität bzw. durch leichte Vorstimulierung kann der Effekt der Kälteaktivierung nach Salzadaptation verstärkt werden.

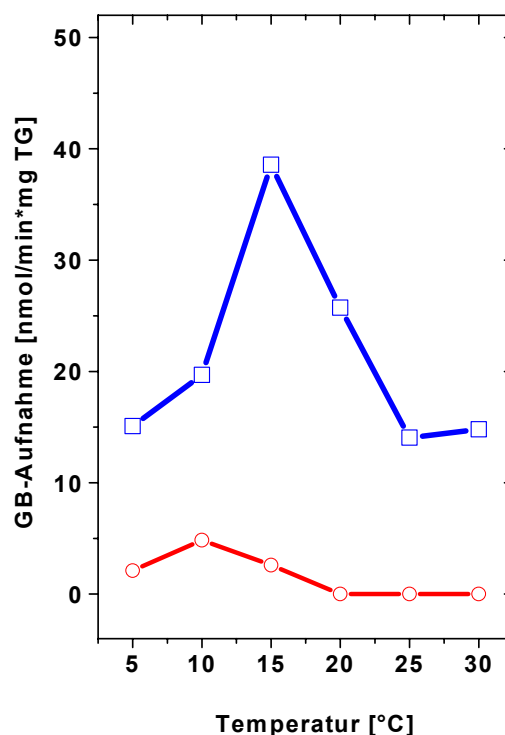


Abb. 28 Temperaturabhängige Aktivität von BetP im Stamm *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T nach Salzadaptation. Die Zellen wurden bei 30 °C mit 750 mM NaCl inkubiert, als externer Puffer wurde 50 mM KP_i , pH 7,5, 50 mM NaCl (200 mosmol, Kreise) sowie 50 mM KP_i , pH 7,5, 150 mM NaCl (400 mosmol, Rechtecke) verwendet. Die Aufnahmemessung wurde durch Zugabe von 250 μ M ^{14}C -Glycinbetain gestartet.

3.12 Bestimmung der Phospholipidzusammensetzung nach Osmoadaptation in *C. glutamicum* DHPF pXMJ19 betP C252T

Zellen, die an hohe Salzkonzentrationen im Medium angepasst waren, zeigten weiterhin eine Aktivierung von BetP durch tiefe Temperaturen. Allerdings fiel diese im Vergleich zu den Kontrollbedingungen (Kultivierung bei 30 °C, ohne Osmoadaptation) geringer aus. Weiterhin zeigte das Aktivierungsprofil in Abhängigkeit zur Osmolalität eine leichte Verringerung der Sensitivität nach Salzadaptation (vgl. 3.11). Somit bestand auch hier die Frage, ob eine mögliche Erklärung für dieses Regulationsverhalten in einer veränderten Membranbeschaffenheit liegen könnte. In diesem Versuchsteil wurden Membranen aus salzadaptierten Zellen nach Kultivierung bei 30 °C analysiert. In *E. coli* wurde bereits gezeigt, dass eine Erhöhung der Osmolalität des Mediums zu einer Zunahme von Cardiolipin und einer Abnahme von PG führt (Tsatskis *et al.*, 2005).

Die Zusammensetzung der Phospholipide nach Adaptation der Zellen an hohe Osmolalitäten ist im Folgenden in Abb. 29 und Abb. 30 dargestellt. Beim Vergleich der Zusammensetzung der Fettsäuren (Abb. 29) sowie der Kopfgruppen (Abb. 30) nach Kultivierung bei 30 °C, mit und ohne Salzadaptation, zeigte sich kein Einfluss der hohen Osmolalität des Mediums im Vergleich zur Kontrollbedingung. Schlussfolgernd konnte ein Einfluss der Membranumgebung auf die Osmoregulation und Kältereulation von BetP nach Osmoadaptation ausgeschlossen werden.

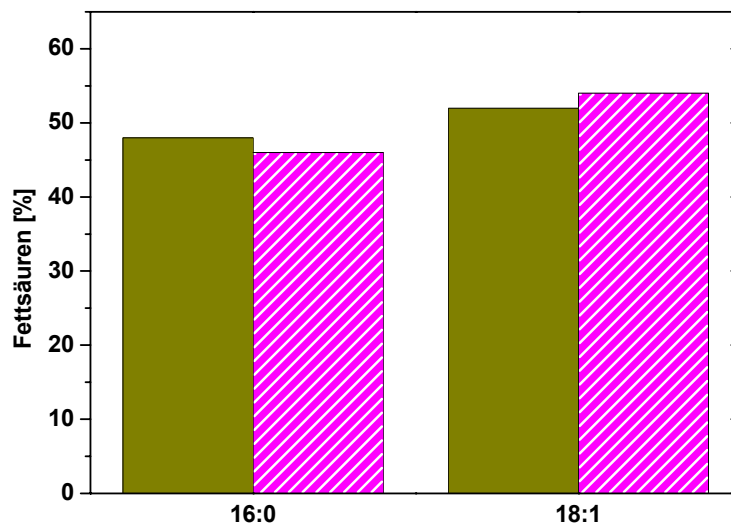


Abb. 29 Zusammensetzung der Fettsäuren der Phospholipide in *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T nach Salzadaptation im Vergleich zu Kontrollbedingungen bei 30 °C. Dargestellt ist die relative Verteilung der Fettsäuren in der spätexponentiellen Phase nach Kultivierung bei 30 °C (grün) sowie nach Salzadaptation durch 750 mM NaCl (gestreift).

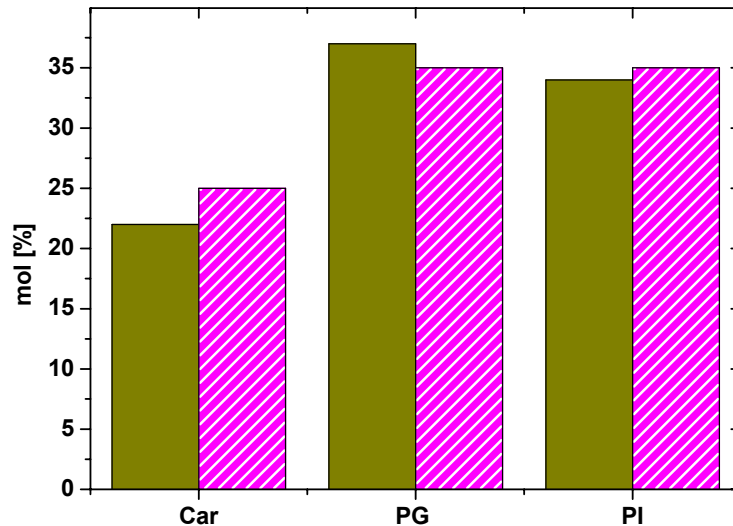


Abb. 30 Zusammensetzung der Kopfgruppen der Phospholipide in *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T nach Salzadaptation im Vergleich zu Kontrollbedingungen bei 30 °C. Dargestellt ist die relative Verteilung der Kopfgruppen in der spätexponentiellen Phase nach Kultivierung bei 30 °C (grün) sowie nach Salzadaptation durch 750 mM NaCl (gestrichelt).

3.13 Bestimmung der internen Solute in *C. glutamicum* DHPF pXMJ19 betP C252T nach Osmoadaptation sowie nach Variation der Kultivierungstemperatur

Es konnte im vorherigen Abschnitt gezeigt werden, dass die Abnahme der Osmosensitivität nach Kultivierung der Zellen unter hohen Salzbedingungen nicht durch eine veränderte Phospholipidumgebung erklärt werden kann. Da die Zellen während der Kultivierungen osmotischem Stress ausgesetzt waren, ist grundsätzlich eine Akkumulation kompatibler Solute zu erwarten. Als Medium wurde das betainhaltige BHI-Medium verwendet, so dass eine Akkumulation von Betain angenommen werden konnte. Somit könnten die Änderungen im Aktivierungsprofil möglicherweise auf eine erhöhte interne Betainkonzentration nach Osmoadaptation zurückzuführen sein. Es wäre weiterhin möglich, dass die Waschschrte der Zellen vor den Aufnahmemessungen in niedrigosmotischem Puffer nicht ausreichend war, um das Betain bei einem down-shock effektiv zu entfernen.

In diesem Teil sollte geklärt werden, ob die Zellen während der Adaptationsphase bedeutende Mengen kompatibler Solute akkumulieren, die durch zweimaliges Waschen in Puffer vor der Aufnahmemessung nicht ausreichend reduziert werden. Ein hoher interner Pool kompatibler Solute könnte eine Erklärung dafür sein, dass eine höhere externe Osmolalität zur Stimulierung des Proteins erforderlich ist (Botzenhardt *et al.*, 2004).

Dazu wurde *C. glutamicum* DHPF pXMJ19 betP C252T bei 30 °C in BHI-Medium mit 750 mM NaCl kultiviert. Nach Erreichen der spätexponentiellen Phase wurden die Zellen geerntet und in 50 mM KP_i , pH 7,5, 50 mM NaCl gewaschen. Damit wurden die Zellen identisch zu den Transportmessungen vorbereitet. Der Zellaufschluss erfolgte durch 0,1 % CTAB. Der interne Pool der kompatiblen Solute Betain (Zusammenarbeit mit M. Stein, AG Galinski, Universität Bonn) und Prolin wurde mit Hilfe der HPLC ermittelt. Da die Zellen während der Aufarbeitung für die Transportmessungen durch die Osmolalität des Waschpuffers (0,2 osmol/kg) einem down-shock ausgesetzt waren, wurden zum Vergleich Zellen unter isoosmotischen Bedingungen (1,8 osmol/kg) gewaschen. Unter niedrigosmotischen Waschbedingungen wurde ein interner Prolinpool mit ca. 2,5 $\mu\text{mol/g}$ TG und unter isoosmotischen Waschbedingungen mit ca. 15 $\mu\text{mol/g}$ TG detektiert (Daten nicht gezeigt). Dies entsprach einer basalen Prolinkonzentration, wie sie ebenfalls unter Kontrollbedingungen vorliegt (Özcan, 2003). Im Gegensatz zu den basalen Prolinwerten zeigte sich eine deutliche Akkumulation des Solute Betain. Nach dem niedrigosmotischen Waschen der Zellen wurde eine interne Betainkonzentration mit Werten von ca. 0,6 mmol/g TG nachgewiesen (Abb. 31). Demgegenüber konnte nach dem Waschen unter

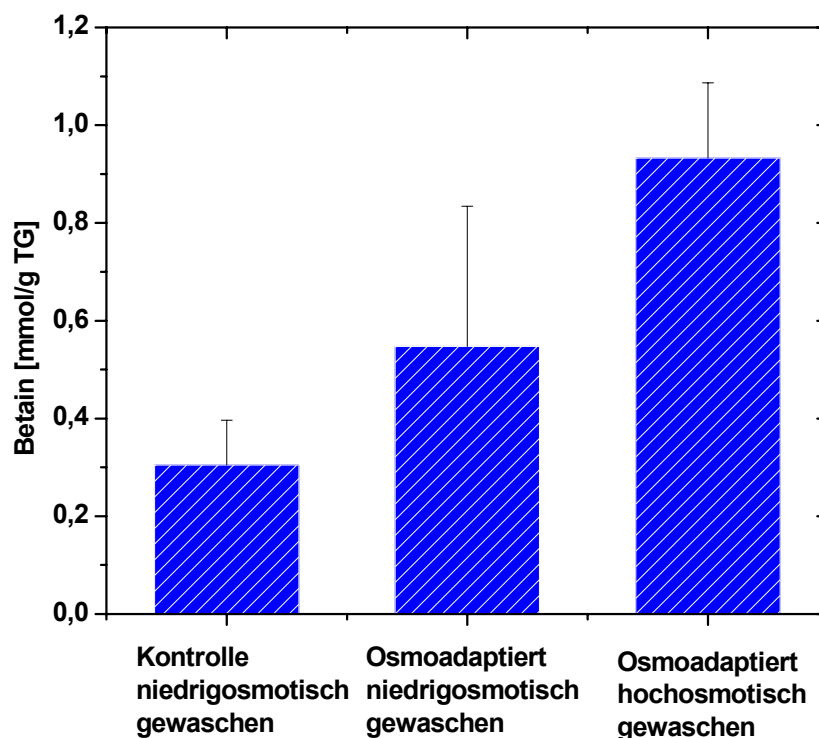


Abb. 31 Interne Betainkonzentration kompatibler Solute in *C. glutamicum* DHPF pXMJ19 betP C252T nach Kultivierung in BHI-Medium bei 30 °C (Kontrolle) sowie mit Zusatz von 750 mM NaCl (Osmoadaptiert). Nach Erreichen der spätexponentiellen Phase wurden die Zellen geerntet und in 50 mM KP_i , pH 7,5 (0,2 osmol/kg, niedrigosmotisch) sowie (1,5 osmol/kg, hoch- bzw. isoosmotisch) gewaschen. Die Einstellungen der entsprechenden Osmolalitäten erfolgte durch Zugabe von NaCl. Der Zellaufschluss erfolgte durch 0,1 % CTAB.

isoosmotischen Bedingungen ein interner Betainpool von ca. 0,9 mmol/g TG detektiert werden.

Schlussfolgernd zeigten diese Ergebnisse, dass nach Salzadaptation ein relativ hoher Pool des kompatiblen Solute Betain vorlag, der auch durch zweimaliges Waschen der Zellen in Puffer nicht drastisch reduziert wurde. Demzufolge könnte die Abnahme der Osmosensitivität nach Osmoadaptation auf den Pool interner kompatibler Solute zurückgeführt werden, der eine vergleichsweise hohe externe Osmolalität zur Stimulierung des Transporters bedingte.

Bisher wurde die Abnahme der BetP Osmosensitivität nach Kälteadaptation ausschließlich auf die drastische Änderung der Phospholipidzusammensetzung zurückgeführt. Aufgrund des hohen Pools kompatibler Solute nach Salzadaptation sollte im Folgenden der interne Betainpool nach Kultivierung bei verschiedenen Temperaturen gemessen werden (Abb. 32). Dazu wurde *C. glutamicum* DHPF pXMJ19 betP C252T bei 10 – 40 °C kultiviert, nach Erreichen der spätexponentiellen Phase geerntet und in 50 mM KP_i , pH 7,5, 50 mM NaCl (0,2 osmol/kg) gewaschen. Mit Ausnahme von 40 °C, wo kein internes Betain nachgewiesen wurde, wurden bei allen anderen Kultivierungstemperaturen interne Betainkonzentrationen von

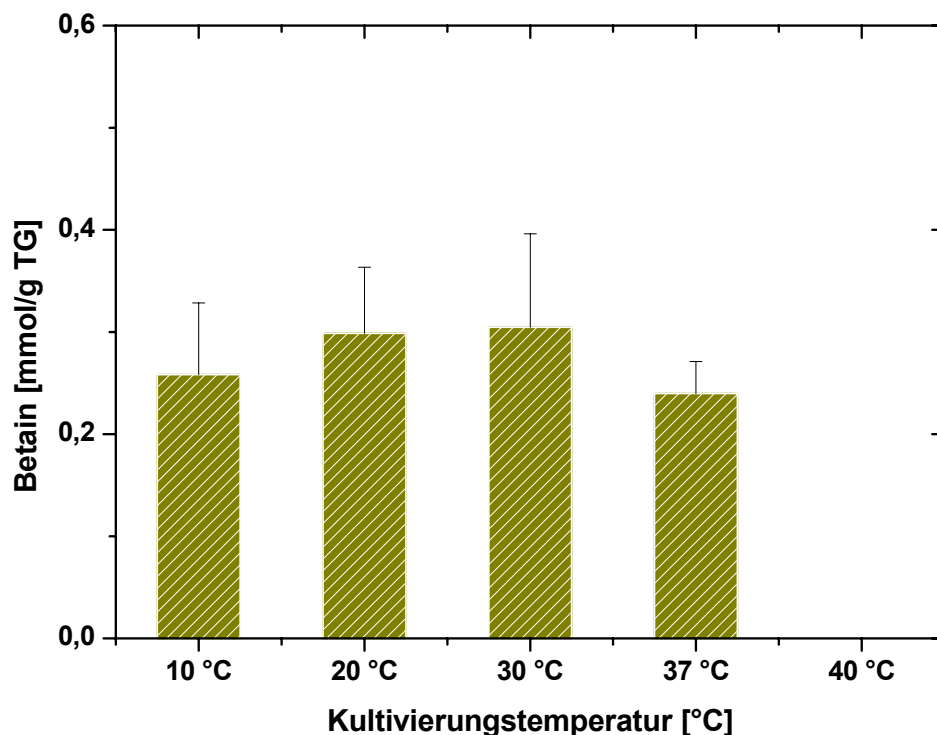


Abb. 32 Interne Betainkonzentration in *C. glutamicum* DHPF pXMJ19 betP C252T nach Variation der Kultivierungstemperatur (10 °C – 40 °C) in BHI-Medium. Nach Erreichen der spätexponentiellen Phase wurden die Zellen geerntet und in 50 mM KP_i , pH 7,5 (0,2 osmol/kg) gewaschen. Der Zellaufschluss erfolgte durch 0,1 % CTAB.

ca. 0,2 mmol/g TG detektiert. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der interne Betainpool zum Zeitpunkt der Aufnahmemessungen keine Abhängigkeit zur Kultivierungstemperatur bei 10 °C bis 37 °C aufweist.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass der interne Pool kompatibler Solute in *C. glutamicum* DHPF pXMJ19 betP C252T keinen Einfluss auf die Osmoregulation und Kältereulation von BetP nach Adaptation an verschiedene Kultivierungstemperaturen ausübt.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden mögliche Strategien zur Detektion von Kältestress des sekundären Na⁺/Betain Symporters BetP aus *Corynebacterium glutamicum* untersucht. Der Carrier BetP ist in der Lage, hyperosmotische Bedingungen über die Messung der internen Kaliumkonzentration und unter Beteiligung der C-terminalen Domäne des Proteins wahrzunehmen. Mit Hilfe einer Kalium-insensitiven Mutante, die weiterhin durch Kältestress aktivierbar ist, konnte gezeigt werden, dass die interne Kaliumkonzentration keinen Einfluss auf die Kälteaktivierung von BetP ausübt. Für die Detektion von Kälte- und Osmostress sind somit unterschiedliche Sensormechanismen verantwortlich. Der Verlust der Kälteaktivierung im heterogenen *E. coli*-System sowie nach Rekonstitution des gereinigten Proteins in Liposomen variierender Lipidzusammensetzung verstärken die Hinweise darauf, dass die direkte Interaktion zwischen der Membran und BetP zur Wahrnehmung von tiefen Temperaturen verantwortlich ist. Phospholipidanalysen von *C. glutamicum* nach Anzucht der Zellen bei verschiedenen Temperaturen zeigten eine Abhängigkeit zwischen der Kultivierungstemperatur und der Zusammensetzung der Fettsäuren und Kopfgruppen der Phospholipide. Durch gezielte Variation der Membrenumgebung in *C. glutamicum* in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur konnte dieses homologe System zur Untersuchung des Einflusses der Membrenumgebung auf die Kälteaktivierung von BetP herangezogen werden. Die *in vivo* erhaltenen Daten zur Kälte- und Osmoregulation des Carriers sowie die mögliche Funktion von BetP als Kältesensor wurden durch detaillierte Phospholipidanalysen untermauert.

Physiologische Bedeutung kompatibler Solute bei der Kälteadaptation von *C. glutamicum*

Das Wachstumsoptimum von *C. glutamicum* wird bei einer Temperatur von 30 °C erreicht. Nach Überführen der Zellen in Medium mit tiefer Temperatur zeigt sich keine typische lag-Phase, sondern ein verlangsamtes, allerdings stetiges und moderates Wachstum. Das mesophile Bakterium *C. glutamicum* ist sogar bei einer Temperatur von 2 °C in der Lage zu wachsen und zeichnet sich somit durch eine hohe Kältetoleranz aus.

Es ist allgemein bekannt, dass bei der Adaptation an Kältestress kompatible Solute eine Schutzfunktion ausüben können. In *C. glutamicum* wurde bei Kultivierungstemperaturen von 2 °C - 30 °C kein Wachstumsvorteil durch die externe Verfügbarkeit kompatibler Solute nachgewiesen.

Kälteprotektive Eigenschaften kompatibler Solute wurden im Gegensatz zu *C. glutamicum* in einer Vielzahl anderer Organismen gezeigt. So wurde ein deutlicher Wachstumsvorteil bei

der Kälteadaptation in *Listeria monocytogenes* durch die externe Verfügbarkeit von Betain oder in *V. pantothenicus* durch die Akkumulation von Ectoin erzielt (Angelidis und Smith, 2003; Kuhlman, 2002). Auch die Kälteresistenz von *Lactobacillus salivarius* konnte nach heterologer Expression von BetL aus *L. monocytogenes* deutlich gesteigert werden (Sheehan *et al.*, 2006).

Neben Mikroorganismen konnten kälteprotektive Eigenschaften des kompatiblen Soluts Betain in zahlreichen Pflanzen wie Tabak, Weizen, Gerste und Erdbeeren nachgewiesen werden (Allard *et al.*, 1998; Kishitani *et al.*, 1994; Rajashekar *et al.*, 1999; Holmström *et al.*, 2000).

Obwohl in *C. glutamicum* unter den Versuchsbedingungen kein Wachstumsvorteil durch die externe Verfügbarkeit kompatibler Solute gezeigt wurde, konnte eine Akkumulation der psychroprotektiven Substanzen Betain und Prolin bei Kältestress detektiert werden. Im Fall von Betain wurde ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Stärke des eingesetzten Kältestresses und der akkumulierten Betain-Konzentration nachgewiesen, was eine Korrelation zwischen der Stärke des eingesetzten Reizes und der Stärke der Stressantwort widerspiegelt. Die Aufnahme von Betain bei der Kältestressanpassung erfolgt mit Hilfe der Transportsysteme BetP und LcoP, wobei der Carrier BetP die stärkste Kälteaktivierung aufweist. Es ist bekannt, dass das Gen *betP*, welches sowohl bei osmotischem Stress als auch bei Kältestress unter der Kontrolle des Zwei-Komponenten-Systems MtrAB steht, bei Kältestress verstärkt exprimiert wird (Möker *et al.*, 2004; Özcan, 2003, Özcan *et al.*, 2005). Darüber hinaus wurde mit Hilfe von *Immuno-Assays* in dieser Arbeit nachgewiesen, dass eine Temperaturerniedrigung eine Steigerung der BetP-Proteinmenge zur Folge hat. Die Schutzfunktion kompatibler Solute in *C. glutamicum* konnte bisher weder bei der Anpassung an hyperosmotische Bedingungen noch an Kältestress durch einen Wachstumsvorteil beschrieben werden. Allerdings deuten die kälteinduzierten Reaktionen von BetP auf Aktivitätsebene und auf Expressionsebene sowie die verstärkte BetP-Proteinsynthese darauf hin, dass kompatible Solute auch in *C. glutamicum* eine wichtige Funktion bei der Adaptation an niedrige Temperaturen ausüben.

Der Vergleich der akkumulierten Mengen zeigt bei Kälteadaptation mit Werten von ca. 120 - 250 $\mu\text{mol/g}$ BTM eine um den Faktor von ca. 4 geringere Konzentrationen kompatibler Solute im Vergleich zu hyperosmotischen Bedingungen (1 M NaCl im Medium). Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Mengen könnte darin liegen, dass bei hyperosmotischem Stress eine vergleichsweise höhere Menge kompatibler Solute notwendig ist, um sowohl eine osmotische Kompensation als auch eine Schutzfunktion der Proteine zu gewährleisten. Demgegenüber beschränkt sich die Funktion kompatibler Solute bei Kältestress auf den Schutz der Proteine, da die Temperatur nur geringfügige Effekte auf die Wasseraktivität ausübt. Die molekularen Mechanismen der Psychroprotektion von

Mikroorganismen durch kompatible Solute lassen sich nicht auf identische Weise im Vergleich zur Osmoprotektion durch das „preferential exclusion“ Modell beschreiben (Arakawa und Timasheff, 1985), da Änderungen der Temperatur im Gegensatz zur Osmolalität kaum Einfluss auf die Wasseraktivität in der Zelle ausüben. Dennoch ist eine stabilisierende Wirkung von kompatiblen Soluten bei Kältestress von besonderer Bedeutung, da durch die niedrige Temperatur Enzymkinetiken in der Zelle verlangsamt ablaufen und nicht genügend Energie zur korrekten Faltung der Proteine vorhanden ist. Bei Kälte werden hydrophobe Interaktionen geschwächt, und ionische Interaktionen nehmen zu, so dass die Interaktionen von Proteinuntereinheiten und Protein-Membran-Interaktionen geschwächt werden (Privalov und Grill, 1988). In *in vitro* Frost-Tau-Experimenten mit Lactatdehydrogenase und Phosphofruktokinase konnten für Ectoin proteinstabilisierende Eigenschaften nachgewiesen werden (Lippert und Galinski, 1992). Auch wenn diese Bedingungen nur bedingt auf Temperaturen über 0 °C übertragbar sind, bestätigen sie die Stabilisierung von Proteinen durch kompatible Solute.

Die BetP Sensor-Domäne für die Detektion von Kältestress und Osmostress ist nicht identisch

Durch die funktionelle Rekonstitution von C-terminal verkürzten BetP-Varianten in Proteoliposomen konnte eine Beteiligung der endständigen 25 Aminosäuren der C-terminalen Domäne an der Osmoregulation und Osmosensorik von BetP nachgewiesen werden (Schiller *et al.*, 2006). Während sich das Wildtypprotein durch die Steigerung der Kaliumionenkonzentration im Lumen der Proteoliposomen effektiv stimulieren ließ, zeigte die um 25 Aminosäuren verkürzte BetP Variante bei allen Kaliumionenkonzentrationen eine gleichbleibende Aktivität. Die C-terminal verkürzte Mutante BetP CΔ25 weist somit einen durch osmotischen Stress, der als Steigerung der internen Kaliumkonzentration detektiert wird, nicht weiter stimulierbaren bzw. deregulierten Transport auf. Für die Aktivierung von BetP bei osmotischem Stress wurde dabei eine spezifische Protein/K⁺-Wechselwirkung postuliert, bei der dieser Teil der C-terminale Domäne entweder direkt oder indirekt an der Chemosensorik beteiligt ist (Peter *et al.*, 1998b; Schiller *et al.*, 2004; Schiller *et al.*, 2006).

Es stellte sich daher die Frage, ob die Kältesensorik von BetP über den gleichen oder einen anderen Mechanismus erfolgt. Es galt somit zu klären, ob BetP CΔ25 durch einen plötzlichen Kältestress aktiviert werden kann. Dies würde bedeuten, dass BetP unterschiedliche Sensoren für die Detektion dieser beiden Stressarten besitzt.

Mit Hilfe von Betain-Aufnahmemessungen bei Messtemperaturen von 5 °C - 30 °C konnte gezeigt werden, dass die Deletion der 25 C-terminalen Aminosäuren von BetP keinen Einfluss auf die Kälteaktivierung des Proteins ausübt. Sowohl unter niedrig- als auch unter

hochosmotischen Bedingungen (Stimulierung mit KCl) resultierte das Aktivierungsprofil in einer Optimumskurve mit der maximalen Aufnahmerate bei 15 °C. Dies bedeutet, dass die osmostress-insensitive Mutante BetP Δ 25 durch Temperaturerniedrigung aktiviert werden kann. Untersuchungen der Kaliumionenkonzentration im Cytoplasma von *C. glutamicum* Zellen, die einem plötzlichen Kälteschock ausgesetzt waren, haben bereits gezeigt, dass es unter Kältestressbedingungen nicht zu einer Erhöhung der internen Kaliumkonzentration kommt (Özcan *et al.*, 2005). Zusammenfassend konnte also die interne Kaliumkonzentration durch zwei unterschiedliche Versuchsansätze als Stimulus für die Kälteaktivierung von BetP ausgeschlossen werden. Während hyperosmotischer Stress zu einem Ausstrom von Wasser aus der Zelle führt, übt Kältestress keinen signifikanten Einfluss auf die Wasseraktivität aus. Dadurch erscheint die Akkumulation von Kalium als Antwort auf eine Temperaturerniedrigung nicht sinnvoll.

Somit kann also festgestellt werden, dass BetP Osmostress und Kältestress über zwei unabhängige Mechanismen detektiert. Die Daten deuten darauf hin, dass BetP neben den Eigenschaften eines Osmosensors möglicherweise ebenfalls als Kältesensor fungiert.

Verlust der Kälteaktivierung von BetP nach heterologer Expression in *E. coli*

Die Wahrnehmung von Kältestress kann grundsätzlich über zwei Mechanismen erfolgen: Zum einen ist es möglich, dass BetP selbst den Kältestress detektiert und somit als Kältesensor fungiert. Zum anderen könnte es sein, dass ein zweites Protein essentiell ist, welches den Temperaturreiz detektiert und an BetP vermittelt.

Ein Hinweis darauf, dass BetP möglicherweise kältesensorische Eigenschaften besitzt, hätte in der Erhaltung der Kältereulation des Carriers im heterologen System bestanden, da in *E. coli* das putative Sensorprotein nicht vorhanden sein sollte.

Grundsätzlich wurden temperaturabhängige Aufnahmemessungen des Transporters BetP unter niedrig- sowie hochosmotischen Bedingungen durchgeführt. Die BetP Aktivität im Stamm *E. coli* MKH13 *pbetP* zeigte unabhängig von der externen Osmolalität eine Transportgeschwindigkeit des Proteins nach der Arrhenius-Beziehung. Somit wurde nach heterologer Expression von *betP* in *E. coli* ein Verlust der Kälteaktivierung des Transporters nachgewiesen.

Mögliche Erklärungen für diesen Befund könnte (i) das Vorliegen eines (Sensor-) Proteins sein, das für die Aktivierung verantwortlich ist und in *E. coli* nicht synthetisiert wird, oder (ii) die unterschiedliche Lipidzusammensetzung in *E. coli* und *C. glutamicum* darstellen, die für den Verlust der Kälteaktivierung von BetP verantwortlich sein könnte.

Nach heterologer Expression des *betP* Gens im Stamm *E. coli* MKH13 *pbetP* ist der Schwellenwert der BetP-Aktivierung im Vergleich zu *C. glutamicum* zu niedrigeren

Osmolalitäten verschoben, so dass zur osmotischen Stimulierung des Proteins eine vergleichsweise geringere externe Osmolalität benötigt wird (Peter *et al.*, 1998b; Rübenhagen *et al.*, 2000; Schiller *et al.* 2004). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Verschiebung des Aktivitätsoptimums bei osmotischer Stimulierung durch die unterschiedliche Membranzusammensetzung der Organismen bedingt ist (Schiller *et al.*, 2006). Die Oberfläche der *C. glutamicum* Membran ist zum größten Teil negativ geladen, wohingegen die *E. coli* Membran überwiegend ungeladen ist. So beeinflusst der Gehalt an Phospholipiden mit negativer Nettoladung die zur Aktivierung von BetP benötigte Kaliumkonzentration (Schiller *et al.*, 2006).

Temperaturabhängige Aktivierung von BetP bei Variation der Membranumgebung in Proteoliposomen

Das Proteoliposomen-System stellt die beste Methode dar, um sensorische Eigenschaften von Proteinen aufzuzeigen, da zum einen eine Vielfalt an Variationsmöglichkeiten zur Verfügung steht, zum anderen alle gemessenen Eigenschaften auf das zu untersuchende Protein zurückgeführt werden können. So bietet das Proteoliposomen-System die Möglichkeit, die Lipidzusammensetzung der Membran direkt zu variieren, um mögliche Einflüsse dieser Manipulation auf ein rekonstituiertes Membranprotein zu studieren. Ein Großteil der Untersuchungen zur Osmoregulation von BetP wurde mit Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden durchgeführt. Obwohl BetP in den Membranen von *E. coli* Zellen keine Kälteaktivierung aufwies, wurde das Protein trotzdem in *E. coli*-Liposomen rekonstituiert, um durch Fusion der Proteoliposomen mit Liposomen verschiedener Phospholipid-Zusammensetzung eine Variation der Membranumgebung zu erzielen.

Bei allen Lipidvariationen wurde die erfolgreiche Rekonstitution von BetP vor temperaturabhängigen Aufnahmemessungen durch Messung der Osmostress-stimulierbaren Aktivität überprüft, um sicherzustellen, dass der Transporter aktiv und regulierbar rekonstituiert wurde.

Die Membranen von *E. coli* und *C. glutamicum* unterscheiden sich nicht nur in Bezug auf die Zusammensetzung der Kopfgruppen, sondern ebenfalls bezüglich der Fettsäuren voneinander. Während die Plasmamembran von *E. coli* zu 80 % aus Phosphatidylethanolamin (PE), 15 % Phosphatidylglycerol (PG) und 5 % Cardiolipin (Diphosphatidylglycerol, DPG) besteht (Prasad, 1996), ist die Plasmamembran von *C. glutamicum* aus nahezu gleichen Anteilen von PG, PI (Phosphatidylinositol) und Cardiolipin zusammengesetzt (diese Arbeit). Darüber hinaus haben Phospholipidanalysen gezeigt, dass in *C. glutamicum* bei einer Kultivierungstemperatur von 30 °C fast

ausschließlich die Fettsäuren Palmitin- und Ölsäure vorliegen, und diese im Verhältnis 1:1 verteilt sind.

Um sowohl den Einfluss der Kopfgruppen der Phospholipide als auch der Fettsäuren auf die Kälteaktivierung von BetP zu untersuchen, wurden eine Vielzahl von Lipidvariationen innerhalb der Proteoliposomen gewählt. So wurden systematische Änderungen der Verteilung von *E. coli*-Liposomen und der *C. glutamicum* ähnlichen synthetischen Phospholipide POPG, DOPG, DPPG und Tetra-Oleoyl-Cardiolipin untersucht. Eine alternative Möglichkeit, um die Original BetP-Membranumgebung zu simulieren, bot die Fusion von mycolatfreien *C. glutamicum* Liposomen mit den Proteoliposomen. Temperaturabhängige Aufnahmemessungen von BetP in Proteoliposomen ohne *C. glutamicum* Lipide zeigten unabhängig von der externen Osmolalität eine Abhängigkeit der Transportgeschwindigkeit von der Temperatur nach der Arrhenius-Beziehung. Bei Verwendung von *C. glutamicum*-Lipiden wurde keine Aktivierung von BetP nachgewiesen. Zusammenfassend zeigten die Aufnahmemessungen von BetP in Proteoliposomen unter allen Bedingungen einen Verlust der Kälteaktivierung.

Als mögliche Erklärungen für den Verlust der Kälteaktivierung in *E. coli*-Phospholipiden und *E. coli* Zellen sind folgende Szenarien möglich: (i) Die Interaktion von BetP mit einem zweiten Protein, welches essentiell für eine Kälteaktivierung sein könnte, ist weder in *E. coli* Zellen noch in Proteoliposomen möglich. (ii) Durch Rekonstitution des Proteins in vorgeformte *E. coli*-Liposomen konnten die Verhältnisse in *C. glutamicum* nicht in ausreichendem Maße simuliert werden. Möglicherweise verhindert der Einsatz der *E. coli*-Lipide grundsätzlich die Kälteaktivierung von BetP. Die Ladungsverteilung der Membran könnte essentiell dafür sein, ob BetP durch Kältestress aktiviert werden kann. Weiterhin könnte ein exaktes Verhältnis der Fettsäuren Öl- und Palmitinsäure oder der Kopfgruppen PG, PI oder Cardiolipin ausschlaggebend für eine Kälteaktivierung sein. Die exakte Nachahmung der *C. glutamicum* Membran durch den Einsatz synthetischer Phospholipide war allerdings aus Kostengründen nicht durchführbar.

Die exakte Simulierung der *C. glutamicum* Membran könnte für die Kältestimulierung von größerer Bedeutung sein als für die osmotische Aktivierung, da die Membranumgebung bei der Wahrnehmung von osmotischem Stress ausschließlich eine modulierende Rolle einnimmt, wohingegen die Lipidzusammensetzung bei der Kälteaktivierung möglicherweise verantwortlich für die Stimulierung ist. Somit sprechen trotz der beschriebenen Einwände, die im heterologen System in *E. coli*, als auch die *in vitro* gewonnen Daten, nicht gegen die Theorie der Membran als Stimulus der BetP Kälteaktivierung und somit der Funktion von BetP als Kältesensor.

Das Lokalanästhetikum Tetracain hat zur Kälteaktivierung von BetP keinen additiven Effekt

Eine mögliche Beteiligung der Membrenumgebung an der Kälteaktivierung von BetP sollte durch den Einsatz des amphipathischen Lokalanästhetikums Tetracain nach homologer Expression des Gens *betP* in *C. glutamicum* DHPFpXMJ19p*betP* C252T untersucht werden. Tetracain besitzt unter physiologischen Bedingungen eine positive Nettoladung und übt einen signifikanten Einfluss auf den physikalischen Zustand biologischer Membranen aus. Durch Insertion in die Membran moduliert es den physikalischen Status der Lipiddoppelschicht. Dies geschieht vermutlich durch Änderungen der intrinsischen Membranspannung und/oder die Ladungsverteilung an den Oberflächen der Lipiddoppelschicht (Lambert *et al.*, 1995; Peter *et al.*, 1998b; Rübenhagen *et al.*, 2000; Van der Heide *et al.*, 2001). Der spezifische Wirkmechanismus von Tetracain auf einzelne Proteine ist bis heute nicht geklärt. Der Einfluss von Lokalanästhetika auf die Aktivitätsregulation eines osmoregulatorischen Transportproteins wurde bei dem ABC-Transporter OpuA aus *L. lactis* beobachtet (van der Heide *et al.*, 2001). Darüber hinaus ist bereits bekannt, dass die Aktivität von BetP durch amphipathische Substanzen wie Tetracain beeinflusst wird. BetP reagiert bei einer Messtemperatur von 30 °C auf die Zugabe von Tetracain mit einer erhöhten Glycinbetain-Aufnahmeaktivität (Steger *et al.*, 2002). Weiterhin wurde bereits nachgewiesen, dass nicht die Oberflächenladung der Membran, sondern eher die Membranfluidität und/oder Membranspannung die Aktivierung von BetP moduliert, da auch Lokalanästhetika mit unterschiedlicher Ladung den Transporter stimulieren (Steger, 2002).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des Lokalanästhetikums auf die Kälteaktivierung von BetP nach Kultivierung der Zellen bei 30 °C und plötzlichen Änderungen der Temperatur, externen Osmolalität sowie der Tetracainkonzentration untersucht. Bei einer Messtemperatur von 30 °C konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des Carriers sowohl durch Erhöhung der externen Osmolalität als auch durch die Tetracainkonzentration gesteigert werden kann. Dabei liegt bei 30 °C unterhalb einer osmotischen Vollstimulierung ein additiver Effekt zwischen beiden Stimuli vor. Erst bei Einsatz von 400 mM NaCl war die Aktivität des Proteins durch Tetracain nicht weiter zu steigern. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei einer Messtemperatur von 10 °C die maximale Betain-Aufnahme, die weder durch Erhöhung der externen Osmolalität, noch der Tetracainkonzentration zusätzlich gesteigert werden konnte. Bezüglich der Aktivitätsregulation des Transporters lässt sich schließen, dass BetP von drei Seiten stimuliert werden kann: (i) durch Kältestress, (ii) durch Erhöhung der externen Osmolalität sowie (iii) durch das Lokalanästhetikum Tetracain. Ist BetP durch einen der Stimuli bereits maximal aktiv, so ist ein additiver Effekt bzw. eine weitere Stimulierung des Carriers ausgeschlossen.

Die Wirkung von Tetracain ähnelt phänomenologisch eher einer Kältestimulierung als einer osmotischen Aktivierung, da zum einen die Wirkung über die Membran unabhängig von der Ladungsverteilung ist. Zum anderen zeigt sich eine weitere Übereinstimmung zwischen den Effekten von Kältestress und Tetracain in Bezug auf die Aktivitätsregulation des osmoregulierten Transporters EctP, welcher weder durch Tetracain noch durch Kältestress aktiviert werden kann.

Die Phospholipidzusammensetzung in *C. glutamicum* DHPF pXMJ19betP C252T ist in hohem Maße von der Kultivierungstemperatur abhängig

Mikroorganismen können die Zusammensetzung der Membran und somit die Membranfluidität im Rahmen des von ihnen tolerierten Temperaturspektrums und entsprechend der externen Gegebenheiten aktiv anpassen. So reagieren Bakterien auf Temperaturerniedrigung mit Änderungen sowohl der Verteilung längerkettiger, ungesättigter Fettsäuren als auch mit Variationen der Kopfgruppen der Phospholipide (Casadei *et al.*, 2002; Haque und Russell, 2004; Bakholidina *et al.*, 2004).

Sollte die Zusammensetzung der Membranen in *C. glutamicum* ebenfalls eine Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur aufweisen, so stünde ein *in vivo*-System zur Verfügung, das es erlaubt, durch die Kultivierung bei verschiedenen Temperaturen gezielt die Membranzusammensetzung zu manipulieren. Auf diese Weise könnte ein möglicher Einfluss der Phospholipide auf das Regulationsverhalten von BetP bei der Kälteaktivierung untersucht werden.

Mit Hilfe gaschromatographischer Analysen (Zusammenarbeit mit A. Lipski, Universität Osnabrück) sowie LC-ESI-MS/MS Analysen (Zusammenarbeit mit C. Ejsing, MPI, Dresden) wurden die Phospholipide in *C. glutamicum* untersucht. Dazu wurden Zellen verwendet, die mindestens drei Zellteilungen in Medium, das zwischen 10 °C und 40 °C temperiert war, vollzogen hatten. Auffällig war, dass in *C. glutamicum* fast ausschließlich die beiden Fettsäuren Palmitin- und Ölsäure vorlagen. Fettsäuren wie Stearinsäure und Palmitoleinsäure wurden mit marginalen Mengen von maximal ca. 2 % nachgewiesen. Bei der optimalen Wachstumstemperatur von 30 °C als auch bei Adaptation der Zellen an Hitzestress liegen in *C. glutamicum* gleiche Anteile von Palmitin- und Ölsäure vor. Im Gegensatz dazu reagiert *C. glutamicum* bei Erniedrigung der Wachstumstemperatur mit einer Zunahme des Anteils der längerkettigen, ungesättigten Ölsäure und einem gegenläufigen Verhalten der Palmitinsäure, um die Membranfluidität aufrecht zu erhalten.

Eine häufige Anpassungsstrategie an Kältestress stellt die Zunahme des Sättigungsgrades sowie der Länge der Fettsäuren der Phospholipide zur Aufrechterhaltung der Membranfluidität dar und wurde bereits in zahlreichen Organismen wie

Yersinia pseudotuberculosis, *E. coli*, *Bacillus cereus* sowie dem Antarktischbewohner *Methanococcoides burtonii* dokumentiert (Casadei *et al.*, 2002; Bakholidina *et al.*, 2004; Haque und Russell, 2004; Nichols *et al.*, 2004). Die Bedeutung des Anteils verzweigtkettiger Fettsäuren und einer Toleranz gegenüber Kältestress zeigt das Bakterium *L. monocytogenes*. Für das Überleben bei Temperaturerniedrigung ist in diesem Organismus insbesondere ein hoher Anteil von *anteiso*-C-15:0 Fettsäuren entscheidend (Zhu *et al.*, 2005).

C. glutamicum ist in der Lage, die Membranfluidität durch Variation der Anteile von ausschließlich zwei Fettsäurearten zu modulieren, wohingegen Adaptationsstrategien zur Aufrechterhaltung der Membranfluidität anderer Organismen wie *B. cereus* oder *L. monocytogenes* zu Änderungen einer vergleichsweise hohen Anzahl unterschiedlicher Fettsäuren führen.

Neben der Verteilung der Fettsäuren wurde ebenfalls die Zusammensetzung der Kopfgruppen in *C. glutamicum* DHPFpXMJ19betP C252T in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur analysiert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kultivierungstemperatur die Zusammensetzung der Kopfgruppen innerhalb der Phospholipide bestimmt. Bei einer Kultivierungstemperatur von 30 °C lagen nahezu gleiche Anteile der drei Kopfgruppen Phosphatidylglycerol, Cardiolipin und Phosphatidylinositol vor. Demgegenüber wurden bei 10 °C 15 % Cardiolipin, 60 % Phosphatidylglycerol und 22 % Phosphatidylinositol detektiert. Darüber hinaus zeigte die Analyse bei allen Kultivierungstemperaturen keine Präferenz der drei Hauptvertreter der Kopfgruppen gegenüber einer bestimmten Fettsäure. Dies bedeutet, dass auch wenn ungleiche Mengen an Palmitin- und Ölsäure in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur vorlagen, diese immer im gleichen Verhältnis auf die Kopfgruppen der Phospholipide verteilt waren.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten zeigten Unterschiede zu zuvor durchgeführten Analysen der Kopfgruppenverteilung der Phospholipide in *C. glutamicum* ATCC 13032 nach Kultivierung bei 30 °C mit 72 % PG, 8 % PI, 6 % PIM (Phosphatidylinositolmannositol) und 14 % Cardiolipin (Nampoothiri *et al.*, 2002). Durch vergleichende Untersuchungen der Phospholipide im Wildtyp-Stamm *C. glutamicum* ATCC 13032 und im *betP*-Überexpressionsstamm *C. glutamicum* DHPF pXMJ19 betP C252T konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass beide Stämme ein nahezu identisches Phospholipidmuster aufweisen. Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede zwischen den früheren und den aktuellen Untersuchungen könnte an der Verwendung von unterschiedlichen Medien (Voll- und Minimalmedium) liegen. Darüber hinaus könnte es sein, dass bei der früheren Lipidextraktionsmethode ein Teil des DPGs zu PG abgebaut wurde, wodurch wiederum der geringe Anteil des Cardiolipins in den früheren Untersuchungen erklärt werden könnte. Weiterhin wurden die früheren Analysen der Lipide mit Hilfe der

Dünnschichtchromatographie durchgeführt, die sich grundsätzlich durch eine geringere Empfindlichkeit bzw. Genauigkeit auszeichnet.

Der Anteil von ca. 30 % Phosphatidylinositol in der Cytoplasmamembran von *C. glutamicum* bei 30 °C ist erstaunlich, da PI ein essentielles Phospholipid in eukaryotischen Zellen darstellt, das Vorkommen in Prokaryoten allerdings selten beobachtet wurde. In *Mycobacterium sp.* kodiert *pgsA* für eine Phosphatidylinositol-Synthase, welches ein essentielles Enzym ist, und PI somit ein in Mycobakterien lebensnotwendiges Phospholipid darstellt (Jackson *et al.*, 2000). Aufgrund der nahen Verwandtschaft wäre es möglich, dass PI ebenfalls ein essentielles Phospholipid in *C. glutamicum* ist.

Neben *C. glutamicum* wurde ebenfalls eine temperaturabhängige Zusammensetzung der Kopfgruppen der Phospholipide in *Y. pseudotuberculosis* und *B. cereus* nachgewiesen. So führte eine Temperaturniedrigung in *Y. pseudotuberculosis* zu einer deutlichen Zunahme von PE sowie zu Abnahmen von Cardiolipin (DPG), wohingegen *B. cereus* mit einer Zunahme von Cardiolipin und einer Abnahme von PG und PE reagierte (Bakholdina *et al.*, 2004; Haque und Russell, 2004).

Unabhängig von einem individuellen Fettsäuremuster kann zusammengefasst werden, dass Mikroorganismen überwiegend identische Anpassungsstrategien an Kältestress zur Aufrechterhaltung der Membranfluidität wie Änderungen der Fettsäurezusammensetzung, Sättigungszustand, Kettenlänge oder Verteilung der *iso*- und *anteiso*-Fettsäuren zeigen. Demgegenüber gibt es in Bezug auf Änderungen der Kopfgruppen der Phospholipide in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur keine einheitliche Systematik.

Adaptation von *C. glutamicum* an verschiedene Kultivierungstemperaturen beeinflusst die Osmoregulation von BetP

Die Kultivierungstemperatur beeinflusst die Zusammensetzung der Phospholipide in *C. glutamicum*. Um zu überprüfen, ob die Kultivierungstemperatur ebenfalls Auswirkungen auf die Osmoregulation von BetP ausübt, wurde die Osmoregulation des Carriers nach Adaptation der Zellen an verschiedene Temperaturen untersucht.

Bisher dargestellte Untersuchungen betrafen ausschließlich die akute Stressantwort des Carriers auf tiefe Temperaturen, da die Substrataufnahme der Zellen, die bei 30 °C kultiviert wurden, bereits nach dreiminütiger Inkubation bei tiefen Temperaturen und innerhalb weniger Sekunden nach Substratzugabe quantifiziert wurde.

Im Gegensatz dazu wurde an dieser Stelle zwar erneut die schnelle Stressantwort von BetP untersucht, dies erfolgte allerdings nach einer Langzeitadaptation der Zellen an unterschiedliche Kultivierungstemperaturen, die zwischen 12 °C und 40 °C variierten.

Es wurde eine deutliche Abhängigkeit der Osmoregulation bzw. Osmosensitivität des Carriers BetP von der Wachstumstemperatur der Zellen nachgewiesen. Dabei zeigte sich eine fast lineare Reduzierung der Osmosensitivität von BetP mit Abnahme der Kultivierungstemperatur von *C. glutamicum*.

In dieser Arbeit wurde damit erstmals ein Zusammenhang zwischen der kultivierungstemperaturabhängigen Phospholipidzusammensetzung und der Osmoregulation eines Transportproteins nach Adaptation an unterschiedliche Kultivierungstemperaturen nachgewiesen.

Die Kältereulation von BetP wird durch die Adaptation von *C. glutamicum* an verschiedene Kultivierungstemperaturen beeinflusst

Durch Adaptationen der Cytoplasmamembran von *C. glutamicum* an unterschiedliche Wachstumstemperaturen war es ebenfalls möglich, die Lipidumgebung von BetP im homologen System gezielt zu variieren, um den Einfluss der Membrenumgebung auf die Kälteaktivierung des Transporters zu bestimmen.

In diesen Untersuchungen wurde zwischen der Aktivitätsregulation von BetP bei hohen und niedrigen Osmolalitäten unterschieden. Nach Adaptation der Zellen an unterschiedliche Temperaturen wurde unter hochosmotischen Bedingungen eine Zunahme der Aufnahme mit steigender Temperatur detektiert, so dass unabhängig von der Kultivierungstemperatur und Membranzusammensetzung die temperaturabhängige Aufnahme des Carriers bei osmotischer Stimulierung einer Arrhenius-Beziehung folgt.

Demgegenüber lag eine signifikante Korrelation zwischen der Kultivierungstemperatur und der temperaturabhängigen Aktivierung von BetP unter niedrigosmotischen Bedingungen (200 mosmol/kg) vor. Nach Hitzeadaptation der Zellen bei 37 °C und 40 °C ist das Protein nach wie vor in der Lage, durch Kältestress aktiviert zu werden. Allerdings sind nach Kultivierung der Zellen bei 40 °C und einer Messtemperatur von 30 °C noch 50 % der maximalen Aufnahme nachweisbar. Diese Beobachtung kann so interpretiert werden, dass in 40 °C gewachsenen Zellen eine Messtemperatur von 30 °C bereits Kältestress verursacht. So reagiert das Protein nach Kultivierung bei hohen Temperaturen in den adaptierten Membranen scheinbar sensitiver auf Kältestress als nach Anzucht bei der optimalen Wachstumstemperatur.

Wurde *C. glutamicum* unterhalb optimaler Wachstumstemperaturen kultiviert, so war mit Abnahme der Kultivierungstemperatur ein Absinken der Aufnahmeraten zu beobachten. Während BetP nach Kultivierung bei 21 °C noch durch Kältestress aktivierbar war, führte Kälteadaptation der Zellen bei 12 °C zu einem vollständigen Verlust der Kälteaktivierung des Transporters. Je nachdem, bei welcher Temperatur die Zellen kultiviert wurden, resultierte

somit ein unterschiedliches Regulationsverhalten der Betain-Aufnahme des Carriers. Alle Maxima der Kälteaktivierung von BetP nach Kultivierung der Zellen bei 30-40 °C lagen bei einer Messtemperatur von 15 °C. Der Vergleich der maximalen Transportraten in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur zeigt, dass, mit Ausnahme 40 °C adaptierter Zellen, insbesondere die Höhe des Optimums von der Kultivierungstemperatur bestimmt wird.

Zusammenfassend zeigten diese Untersuchungen, dass mit der graduellen Änderung der Phospholipidzusammensetzung eine Änderung des temperaturabhängigen Aktivierungsprofils von BetP zwischen 10 °C und 40 °C korreliert war.

Wie konnte der vollständige Verlust der Kälteaktivierung von BetP nach Kälteadaptation bei 12 °C erklärt werden? Die temperaturabhängigen Aufnahmemessungen wurden bei einer externen Osmolalität von 200 mosmol/kg durchgeführt. Der Vergleich der salzabhängigen Aktivierungsprofile nach Inkubation der Zellen bei 12 °C wies eine signifikante Abnahme der Osmosensitivität von BetP auf, d.h. der Carrier war nach Kälteadaptation der Zellen erst bei höheren Osmolalitäten aktiv.

Um zu überprüfen, ob der Verlust der Kälteaktivierung nach Kälteadaptation unter isoosmotischen Bedingungen möglicherweise an einer Abnahme der Sensitivität der Kältestimulierung lag, wurde die Osmolalität der Messpuffer von 0,2 osmol/kg auf 0,4 - 0,6 osmol/kg erhöht. Es konnte nachgewiesen werden, dass durch geringfügige Voraktivierung des Transporters der Verlust der Kälteaktivierung aufgehoben werden kann, und somit BetP auch in kälteadaptierten Zellen durch Kälteaktivierung charakterisiert ist.

Das Zusammenwirken beider Stimuli weist somit eine deutliche Hierarchiestruktur auf. Es konnte gezeigt werden, dass beide Stresssituationen nicht vollständig unabhängig auf die Aktivierung des Transporters wirken, sondern Interaktionen zwischen Temperatur- und osmotischem Stress vorliegen.

Ein möglicher Grund für die Verschiebung der Osmo- und Kältesensitivität nach Adaptation der Zellen bei niedrigen Temperaturen könnte ein hoher Pool interner kompatibler Solute sein, da eine kälteinduzierte Akkumulation nach Kultivierung in betainhaltigem BHI-Medium bereits nachgewiesen wurde. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein hoher interner Pool an Betain die Aktivierungsschwelle von BetP bei osmotischer Stimulierung erhöht (Botzenhardt *et al.*, 2004). Nach Kultivierung der Zellen bei verschiedenen Temperaturen und zum Zeitpunkt der Aufnahmemessungen, d.h. nach Waschen der Zellen in niedrigosmotischem Puffer, wurden geringe Mengen kompatibler Solute bestimmt. Somit kann der Einfluss kompatibler Solute an der Verschiebung der Sensitivität von BetP nach Kultivierung bei verschiedenen Temperaturen ausgeschlossen werden.

Die Frage, ob BetP kältesensorische Eigenschaften besitzt, oder ob zur Kälteaktivierung von BetP ein Sensorprotein benötigt wird, kann durch Untersuchungen in *C. glutamicum* Zellen

nicht abschließend geklärt werden. Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten weisen allerdings auf einen entscheidenden Einfluss der Phospholipidzusammensetzung auf das temperaturabhängige Aktivierungsprofil von BetP hin. Auch die Quantifizierung des internen Pools kompatibler Solute steht in Übereinstimmung mit dem Modell der Membranumgebung als Stimulus der Kälteaktivierung von BetP.

Für den Fall, dass die Membran den Stimulus für die Kälteaktivierung von BetP darstellt, wäre sowohl der Einfluss der Fettsäuren als auch der Kopfgruppen der Phospholipide als Signal denkbar. Eine Möglichkeit, um den Einfluss der Kopfgruppen auf die Kälteaktivierung von BetP zu untersuchen, wäre die homologe Expression von *betP* in *C. glutamicum* Stämmen, deren Synthesewege für die Herstellung von PG, Cardiolipin oder PI inaktiviert sind, so dass eine unterschiedliche Zusammensetzung der Kopfgruppen vorliegt. Möglicherweise könnte es sich jedoch bei dem Enzym für die PI-Synthese, in Analogie zu Mycobakterien, um ein essentielles Enzym handeln (Jackson *et al.*, 2000).

Eine weitere Möglichkeit, den Einfluss der Membranumgebung auf die Kälteaktivierung von BetP zu untersuchen, wäre der Einsatz von *C. glutamicum* Stämmen, deren Synthesewege für Fettsäuren manipuliert wurden.

Die *de novo* Fettsäure Synthese in Prokaryoten erfolgt üblicherweise mit Hilfe einer Fettsäure- Synthase Typ-II-FAS, wohingegen in Eukaryoten die Synthese mit Hilfe des Multienzymkomplexes Typ-I-FAS katalysiert wird. Eine Ausnahme dazu stellt u.a. *C. glutamicum* mit zwei Fettsäure- Synthasen Typ I-FAS-A und B dar. Während Typ I-FAS-A sowohl die Synthese gesättigter als ungesättigter Fettsäuren katalysiert, werden durch Typ I-FAS-B ausschließlich gesättigte Fettsäuren synthetisiert (Schweizer und Hofmann, 2004, Radmacher *et al.*, 2006). *C. glutamicum* Stämme, deren Fettsäuresynthese durch einzelne oder beide Gene (Δ I-FAS-A und Δ I-FAS-B) deletiert waren, wurden bereits charakterisiert (Radmacher *et al.*, 2006). Im Fall von FAS-A, welches eine Desaturasefunktion besitzt, handelt es sich um ein essentielles Enzym, so dass die Stämme *C. glutamicum* Δ I-FAS-A und *C. glutamicum* Δ I-FAS-AB ölsäureauxotroph sind.

Erste Aktivitätsmessungen von BetP in *C. glutamicum* Δ fasIA und *C. glutamicum* Δ fasIAB zeigten keine Aktivität des Transporters bei osmotischer Stimulierung. Durch immunologischen Nachweis konnte gezeigt werden, dass in beiden Stämmen deutliche Mengen des Carriers vorlagen. Die nicht nachweisbare Aktivität des Transporters ist demzufolge nicht auf eine beeinträchtigte Expression zurückzuführen. In zukünftigen Arbeiten soll der Einfluss der Fettsäurezusammensetzung auf die BetP Aktivität in diesen Stämmen durch weitere Variationen der Kultivierungsbedingungen (Menge zugesetzter Ölsäure sowie Palmitinsäure, Wachstumstemperatur, Osmolalität des Mediums, Voll- bzw. Minimalmedium) untersucht werden.

Erste Untersuchungen zu Transportsystemen, die durch Kältestress aktiviert werden, wurden insbesondere mit dem Protein Gbu aus dem pathogenen Organismus *Listeria monocytogenes* durchgeführt. Darüber hinaus liegen eine Reihe von Erkenntnissen über die Schutzfunktion der kälteaktivierten Carrier bei der Adaptation von *B. subtilis* an niedrige Temperaturen vor. Im Gegensatz dazu konnten bisher keine Mechanismen der Kältesensorik von Transportsystemen, die für die Detektion von Kältestress und der Aktivierung der Proteine verantwortlich sind, nachgewiesen werden. Einzig dem Carrier Gbu aus *L. monocytogenes* wurden mögliche kältesensorische Eigenschaften durch die Detektion von Änderungen des physikalischen Zustandes der Cytoplasmamembran zugesprochen (Gerhard *et al.*, 1996; Gerhard *et al.*, 2000).

Im Gegensatz zu Transportern liegen eine Reihe von Untersuchungen zu anderen Proteinen vor, die Änderungen der Membranfluidität in Abhängigkeit von der Temperatur detektieren können. So wurde ein Mechanismus der Adaptation der Membran an unterschiedliche Temperaturen in *B. subtilis* eingehend untersucht. Das Zwei-Komponenten-System DesK-DesR in *B. subtilis* besteht aus einer Sensor-Kinase, DesK, und einem Antwort-Regulator, DesR. Durch Kälte aktiviert führt die Signaltransduktion über das Zwei-Komponenten-System zur Induktion der Gene, die für die $\Delta 5$ -Desaturase kodieren. Es wird angenommen, dass die membrangebundene Sensor-Kinase DesK als Kältesensor Temperaturerniedrigung durch Änderungen der Membranfluidität detektiert und dadurch aktiviert wird. Durch anschließende Phosphorylierung des Antwortregulators DesR durch DesK wird die Induktion des *des* Gens induziert. Die Desaturase Des katalysiert die Synthese von ungesättigten Fettsäuren, welche die Membranfluidität bei niedriger Kultivierungstemperatur und dadurch die Aktivität von Transportproteinen gewährleisten (Aguilar *et al.*, 1998; Aguilar *et al.*, 2001; Cybulski *et al.*, 2002; Altabe *et al.*, 2003; Albanesi *et al.*, 2004; Cybulski *et al.*, 2004; Mansilla und Mendoza, 2005).

Ein weiterer Kältesensor, der Änderungen der Membranfluidität detektiert und gegebenenfalls die Expression von Genen induziert, die für Desaturasen kodieren, stellt die membrangebundene Histidinkinase Hik33 in *Synechocystis sp.* dar (Inaba *et al.*, 2002).

Osmoadaptation von *C. glutamicum* DHPF pXMJ19 betP C252T beeinflusst die Osmoregulation und temperaturabhängige Aktivierung von BetP

Die Anpassung von *C. glutamicum* an unterschiedliche Kultivierungstemperaturen nimmt Einfluss sowohl auf die Kälte- als auch die Osmoregulation von BetP. An dieser Stelle sollte geklärt werden, ob in umgekehrter Weise das Regulationsverhalten des Carriers ebenfalls durch die Osmolalität des Mediums während der Kultivierung bestimmt wird.

Zur Überprüfung, ob die Phospholipidzusammensetzung in *C. glutamicum* sowie die Kälte- bzw. Osmoregulation von BetP von der Osmolalität des Mediums bestimmt wird, wurden die Zellen an hohe Osmolalitäten bei 30 °C (750 mM NaCl) adaptiert.

Nach Osmoadaptation der Zellen zeigte BetP bei einer akuten Erhöhung der Osmolalität bei der Transportmessung eine Abnahme der Osmosensitivität. Die Reduktion der Salzsensitivität fiel allerdings im Vergleich zu 12 °C adaptierten Zellen deutlich schwächer aus.

Die Osmoadaptation von *C. glutamicum* führte ebenfalls zu Änderungen der Kältereulation von BetP. Der Carrier zeigte hierbei weiterhin eine Kälteaktivierbarkeit, allerdings mit geringeren Transportraten im Vergleich zu Kontrollbedingungen (Kultivierung bei 30 °C unter niedrigosmotischen Bedingungen). Da BetP nach Osmoadaptation sowohl weniger sensitiv auf osmotischen Stress als auch auf Kältestress reagierte, wurde untersucht, ob der Effekt der Kälteaktivierung durch eine geringe osmotische Voraktivierung gesteigert wird. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl nach Osmo- als auch nach Kälteadaptation der Zellen eine geringfügige Erhöhung der Salzkonzentration (osmotische Vorstimulierung des Carriers) zu einer Verstärkung der Kälteaktivierung führt.

Beim Vergleich der Phospholipidmuster salzadaptierter Zellen und niedrigosmotisch gewachsener Zellen zeigte sich keine Änderung in der Verteilung der Fettsäuren oder der Kopfgruppen der Phospholipide. Daher konnte ausgeschlossen werden, dass das Regulationsverhalten von BetP nach Salzadaptation in einer veränderten Membranbeschaffenheit von *C. glutamicum* liegen könnte.

Wie bereits nach Variation der Kultivierungstemperatur bestand auch nach Osmoadaptation der Zellen in betainhaltigem BHI-Medium die Möglichkeit, dass eventuell ein hoher Pool kompatibler Solute zum Zeitpunkt der Aufnahmemessungen die Abnahme der Sensitivität des Transporters bestimmt. Im Fall der Osmoadaptation galt dies sogar als wahrscheinlicher im Vergleich zur Kälteadaptation, da zum einen keine Änderung des Phospholipidmusters nach Osmoadaptation nachgewiesen wurde, und zum anderen bei osmotischem Stress grundsätzlich höhere Konzentrationen kompatibler Solute in *C. glutamicum* akkumuliert werden als bei Kältestress. Durch Analysen der internen Solute wurden signifikante Konzentrationen von Betain (ca. 0,6 mmol/g TG) in osmoadaptierten Zellen nachgewiesen, die unter den Versuchsbedingungen nicht ausreichend entfernt werden konnten.

Die Abnahme der Osmosensitivität von BetP nach Osmoadaptation der *C. glutamicum* Zellen kann somit auf einen erhöhten Pool interner kompatibler Solute zurückgeführt werden, der eine Abnahme der Sensitivität des Transporters BetP sowohl gegenüber Kältestress als auch osmotischem Stress bedingt.

Der Einfluss der Osmoadaptation auf die Membranzusammensetzung sowie das Regulationsverhalten von Proteinen wurden in verschiedenen Organismen untersucht. In Analogie zu *C. glutamicum* wurde eine Abhängigkeit der Phospholipidumgebung von der Osmolalität des Mediums ebenfalls in *Halomonas sp.* ausgeschlossen (Kaye und Baross, 2004).

Im Gegensatz dazu reagiert *E. coli* auf Änderungen der Osmolalität des Mediums mit einer Anpassung der Phospholipidzusammensetzung. So führt eine Erhöhung der Osmolalität des Mediums zu einer Zunahme von Cardiolipin und einer Abnahme von PG in der Cytoplasmamembran. Darüber hinaus beeinflusst die Osmolalität des Mediums die Osmoregulation des Transporters ProP (Tsatskis *et al.*, 2005). Nach Osmoadaptation steigt die externe Osmolalität, die zur Stimulierung von ProP erforderlich ist, d.h. die halbmaximale Aktivität wird bei einer externen Osmolalität von ca. 0,35 mol/kg erreicht, während dies unter Kontrollbedingungen bei ca. 0,2 mol/kg erfolgt. Somit wurde eine deutliche Abnahme der Osmosensitivität des Carriers ProP nach Osmoadaptation nachgewiesen. Es wird argumentiert, dass möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der Osmosensitivität von ProP und der Zusammensetzung der Cytoplasmamembran von *E. coli* nach Osmoadaptation besteht (Tsatskis *et al.*, 2005). Allerdings handelt es sich bei der nachgewiesenen Änderung der Membranzusammensetzung der *E. coli* Zellen nach Osmoadaptation im Vergleich zu Kontrollbedingungen um eine Steigerung des Cardiolipinanteils von ca. 2 % auf lediglich 6 %.

Der Stamm *B. subtilis* $\Delta ywnE$ ist dadurch gekennzeichnet, dass die Cardiolopin-Synthese manipuliert ist, so dass kein Cardiolipin vorliegt und im Vergleich zum Wildtyp geringere Mengen PE synthetisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass diese Mutante im Vergleich zum Wildtyp einen deutlichen Wachstumsnachteil bei Adaptation an osmotischen Stress hat. Es wird daher vermutet, dass der insgesamt höhere Anteil negativ geladener Phospholipide in *B. subtilis* $\Delta ywnE$ bei der Osmoadaptation die negativere Ladung der Membranoberfläche bewirkt, die wiederum die Konzentration von u.a. K^+ -Ionen an der Membran erhöht, und somit eine wichtige Rolle bei der Osmoadaptation spielt (Lopez *et al.*, 2006).

Modell der Kälteaktivierung von BetP

Die Zusammenfassung aller bisherigen sowie der in dieser Arbeit erhaltenen Daten über die Wahrnehmung von Kältestress durch BetP lassen sich zu einem Modell der BetP Aktivierung verknüpfen (Abb.33). Nach Kultivierung von *C. glutamicum* bei 30 °C kann BetP durch Kältestress oder durch osmotischen Stress aktiviert werden. Die durch Kältestress erzielte Aktivität stellt die maximale Aufnahme rate des Transporters bei niedriger Temperatur dar,

d.h. sie kann bei weiterer Stimulierung durch osmotischen Stress (oder Tetracain) nicht zusätzlich gesteigert werden. Die osmosensorischen und osmoregulatorischen Eigenschaften von BetP wurden bereits durch detaillierte Untersuchungen nachgewiesen. So fungiert der Transporter bei osmotischem Stress als Osmoregulator und Osmosensor, indem die interne Kaliumionenkonzentration als Maß für osmotischen Stress detektiert wird (Rübenhagen *et al.*, 2000; Schiller *et al.*, 2004; Schiller *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass im Gegensatz zur Wahrnehmung hyperosmotischer Bedingungen weder die interne Kaliumionenkonzentration, noch die osmoregulatorische Domäne des Proteins

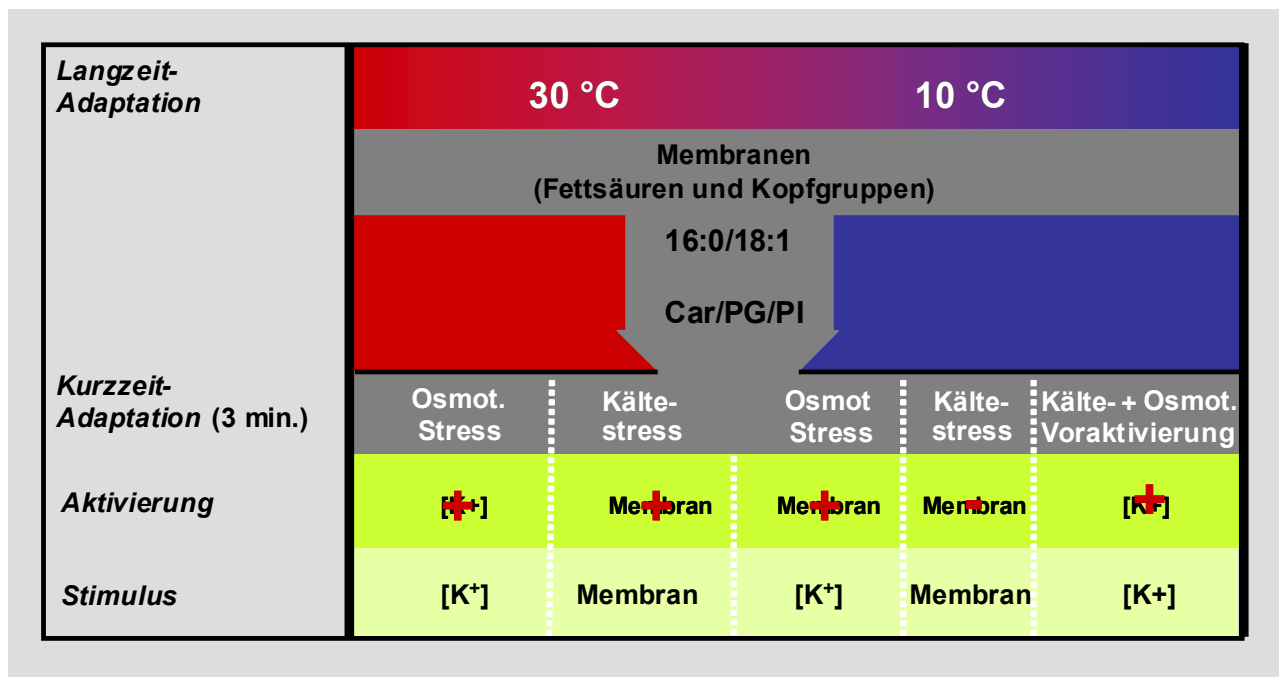


Abb. 33 Abhängigkeit der BetP Aktivierung in *C. glutamicum* von der Kultivierungstemperatur.

Nach Kultivierung der Zellen bei 30 °C kann BetP durch kurzzeitige osmotische Stimulierung (1,2 osmol/kg, 30 °C) oder Kältestress (200 mosmol/kg, 15 °C) aktiviert werden. Adaptation an Kältestress resultiert in einer Anpassung der Fettsäure- und Kopfgruppenverteilung der Phospholipide innerhalb der cytoplasmatischen Membran. Kälteadaptation führt zu einer Zunahme (i) der ungesättigten, länger-kettigen Ölsäure und zu einer Abnahme der Palmitinsäure sowie (ii) zu einer Steigerung des PG-Anteils und einem gegenläufigen Verhalten von Cardiolipin und PI. Nach Kälteadaptation ist weiterhin eine osmotische Aktivierung des Carriers, allerdings keine Kälteaktivierung, möglich. Der Verlust der Kälteaktivierung kann durch geringfügige osmotische Voraktivierung (0,4 osmol/kg, 15 °C) aufgehoben werden. Die interne Kaliumkonzentration repräsentiert den Stimulus der osmotischen Aktivierung. Im Fall der Kälteaktivierung von BetP wird der physikalische Zustand der Membran als möglicher Stimulus postuliert. Weitere Einzelheiten siehe Text.

Einfluss auf die Kälteaktivierung von BetP ausüben (Özcan *et al.*, 2005). Dieses Ergebnis war insofern nicht überraschend, da die Effekte, die durch Kältestress im Vergleich zu osmotischem Stress auf die Zelle einwirken, grundsätzlich von unterschiedlicher Natur sind. Während hyperosmotische Bedingungen Auswirkungen auf die Wasseraktivität in der Zelle ausüben, liegt ein sehr geringer Einfluss der Temperatur auf den In- und Efflux von Wasser vor. Schlussfolgernd wurde ein alternativer Mechanismus für die Detektion von Temperaturerniedrigung gefordert.

Ein signifikanter Einfluss von Kältestress wird durch die Beeinträchtigung der Membranfluidität bei Temperaturerniedrigung deutlich, welche sich insbesondere auf Transportprozesse innerhalb der Cytoplasmamembran auswirkt. Es ist bekannt, dass die Osmoregulation von BetP durch die Membranumgebung beeinflusst wird. Ladungsänderungen der Membranoberfläche, bedingt durch die Variation der Kopfgruppen der Phospholipide, führen zu einem veränderten Aktivierungsprofil von BetP bei osmotischem Stress. Im Gegensatz dazu resultieren Variationen der Zusammensetzung der Phospholipide bei Kältestress in drastischeren Effekten. Die durch die Kälteadaptation von *C. glutamicum* bedingten Änderungen der Lipidzusammensetzung bei gleich bleibender Ladung der Membranoberfläche führen zu einem vollständigen Verlust der Kälteaktivierung von BetP unter niedrigosmotischen Bedingungen. Daher wird vermutet, dass der Zustand der Membran, welche unter hyperosmotischen Bedingungen modulierende Eigenschaften auf das Regulationsverhalten ausübt, im Fall der Kälteaktivierung von BetP von größerer Bedeutung ist. Der vollständige Verlust der Kälteaktivierung von BetP nach Kälteadaptation der Zellen kann durch leichte osmotische Vorstimulierung aufgehoben werden, wodurch sowohl eine Hierarchiestruktur als auch eine Interaktion beider Stimuli aufgezeigt wird. Diese Interaktion ist allerdings nur dann möglich, wenn der Carrier nicht durch Kältestress bereits maximal aktiviert ist. Durch physiologische Studien wurde gezeigt, dass der interne Pool kompatibler Solute bei der Kälteaktivierung von BetP keinen Einfluss ausübt. Somit wird postuliert, dass der Carrier möglicherweise selbst Temperaturunterschiede über eine veränderte Protein-Lipid-Interaktion detektiert, und somit BetP als Kältesensor fungiert.

5. Zusammenfassung

Unter Kältestress oder hyperosmotischen Bedingungen vermittelt der sekundäre Transporter BetP die Aufnahme des für *Corynebacterium glutamicum* wichtigsten kompatiblen Soluts Glycinbetain im Symport mit zwei Natrium-Ionen. In dieser Arbeit wurde die Kälteaktivierung von BetP im Detail untersucht. Neben der Regulation auf Aktivitätsebene wurde gezeigt, dass BetP sowohl auf Expressions- als auch auf Translationsebene bei Kältestress reguliert ist. Die Aktivierung von BetP kann durch unterschiedliche Stimuli wie Kältestress, hyperosmotische Bedingungen sowie das Lokalanästhetikum Tetracain erfolgen. Es wurde gezeigt, dass eine maximale Stimulierung des Carriers durch einen der Faktoren bei Anwesenheit einer zusätzlichen Stresssituation nicht weiter gesteigert werden kann. Unter hyperosmotischen Bedingungen erfolgt die Aktivierung von BetP durch eine Erhöhung der internen Kaliumionenkonzentration unter Beteiligung der C-terminalen Extension des Proteins. Eine um 25 Aminosäuren der C-terminalen Extension deletierte BetP Mutante, die ihre Fähigkeiten zur Osmosensorik und Osmoregulation verloren hat, konnte weiterhin durch Kältestress aktiviert werden. Dies bewies, dass weder die interne Kaliumionenkonzentration, noch die osmosensorische Domäne Einfluss auf die Kälteaktivierung ausüben, so dass gefordert werden muss, dass die Kältesensorik von BetP über einen unabhängigen Mechanismus erfolgt. Änderungen des Membranzustandes als möglicher Stimulus der Kälteaktivierung von BetP oder eine mögliche Beteiligung eines zweites Proteins, wurde sowohl nach (i) heterologer Expression von *betP* im *E. coli* System als auch nach (ii) Rekonstitution des gereinigten Proteins in Liposomen variierender Membranzusammensetzung untersucht. Aufgrund der Tatsache, dass in beiden Systemen Kälteaktivierung von BetP nicht festgestellt wurde, konnte die Frage der Membran als Stimulus der Kälteaktivierung von BetP nicht eindeutig geklärt werden. Ein alternatives System, um den Einfluss der Membran auf die Kälteaktivierung des Carriers zu untersuchen, stellte die Langzeitadaptation von *C. glutamicum* Zellen an verschiedene Temperaturen dar. Die Variation der Kultivierungstemperatur führte zu signifikanten Änderungen der Phospholipidzusammensetzung der Cytoplasmamembran, sowohl bezüglich der Kettenlänge und des Sättigungsgrades der Fettsäuren als auch der Verteilung der Kopfgruppen der Phospholipide. Durch gezielte Variation der Phospholipide der Cytoplasmamembran in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität des Carriers gegenüber Kältestress in hohem Maße mit der Phospholipidumgebung korreliert. Physiologische Studien über den Einfluss des internen Pools kompatibler Solute bei der Kälteaktivierung von BetP unterstützen die Hypothese, dass der Carrier möglicherweise selbst Temperaturunterschiede über eine veränderte Protein-Lipidinteraktion detektiert, und somit BetP als Kältesensor fungiert.

6 Literaturverzeichnis

Aguilar, P.S., Cronan, J.E., Mendoza, D. 1998. A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. *J. Bacteriol.* **180**: 2194-2200.

Aguilar, P.S., Hernandez-Arriaga, A.M., Cybulski, L.E., Erazo, A.C., Mendoza, D. 2001. Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* **20**: 1681-1691.

Albanesi, D., Mansilla, M.C., Mendoza, D. 2004. The membrane fluidity sensor DesK of *Bacillus subtilis* controls the signal decay of its cognate response regulator. *J. Bacteriol.* **186**: 2655-2663.

Altabe, S.G., Aguilar, P., Caballero, G.M., Mendoza, D. 2003 The *Bacillus subtilis* acyl lipid desaturase is a delta5 desaturase. *J. Bacteriol.* **185**: 3228-3231.

Angelidis, A.S., Smith, L.T., Hoffman, L.M., Smith, G.M. 2002. Identification of OpuC as a chill activated and osmotically activated carnitine transporter in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiol.* **68**: 2644-2650.

Angelidis, A.S., Smith, G.M. 2003. Role of the glycine betaine and carnitine transporters in adaptation of *Listeria monocytogenes* to chill stress in defined medium. *Applied and Environmental Microbiol.* **69**: 7492-7498.

Arakawa, T., Timasheff, S.N. 1985. The stabilization of proteins by osmolytes. *Biochem. J.* **47**: 411-414.

Bakholdina, S.I., Sanina, N.M., Krasikova, I.N., Popova, O.B., Solov'eva, T.F. 2004. The impact of abiotic factors (temperature and glucose) on physicochemical properties of lipids from *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biochem.* **86**: 875-81.

Baskakov, I., Bolen, D.W. 1998. Forcing thermodynamically unfolded proteins fold. *J Biol Chem* **273**: 4831-4834.

Bayles, D.O., Wilkinson, B.J. 2000. Osmoprotectants and cryoprotectants of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiol.* **30**: 23-27.

Berrier, C., Besnard, M., Ajouz, B., Coulombe, A., Ghazi, A. 1996. Multiple mechanosensitive ion channels from *Escherichia coli*, activated at different thresholds of applied pressure. *J. Membr. Biol.* **151**: 175-187.

Blum, H., Beier, H., Gross, H. J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.

Blunden, G., Baroundi, E.L., Godon, S.M., McLean, W.F.H., Rogers, D.J. 1981. Extraction, purification and characterization of Dragendorff-positive compounds from British marine algae. *Botanica marina* **23**: 451-456.

Bolen, D.W., Baskakov, I. 2001. The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *J Mol Biol* **310**: 955-963.

Botzenhardt, J., Morbach, S., Krämer, R. 2004. Activity regulation of the betaine transporter BetP of *Corynebacterium glutamicum* in response to osmotic compensation. *Biochim Biophys Acta* **1667**: 229-240.

Botzenhardt, J. 2004. Regulation des Betaintransporters BetP aus *Corynebacterium glutamicum* während der Anpassung an hyperosmotischen Stress. *Dissertation Universität zu Köln*

Bovell, C.R., Packer, L., Helgerson, R. 1963. Permeability of *Escherichia coli* to organic compounds and inorganic salts measured by light scattering. *Biochim Biophys Acta* **75**: 257-266.

Bremer, E., Krämer, R. 2000. Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. *In*: G. Storz und R. Hengge-Aronis (Herausg.), Bacterial stress responses, S. 79-97. ASM Press, Washington, D.C., USA

Brigulla, M., Hoffman, T., Krisp, A., Völker, A., Bremer, E., Völker, U. 2003. Chill induction of the SigB-Dependent General Stress Response in *Bacillus subtilis* and its contribution to low-temperature adaptation. *J. Bacteriol.* **185**: 4305-4314.

Budde, I., Steil, L., Scharf, C., Völker, U., Bremer, E. 2006. Adaptation of *Bacillus subtilis* to growth at low temperature: a combined transcriptomic and proteomic appraisal. *Microbiology* **52**: 831-853.

Casadei, M. A., Mañas, P., Niven, G., Needs, E., Mackey, B. M. 2002. Role of membrane fluidity in pressure resistance of *Escherichia coli* NCTC 8164. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5965-5972

Cybulski, L.E., Albanesi, A., Mansilla, M.C., Altabe, S., Aguilar, P.S., de Mendoza, D. 2002. Mechanism of membrane fluidity optimization: isothermal control of the *Bacillus subtilis* acyl-lipid desaturase. *Mol. Microbiol.* **45**: 1379-1388.

Cybulski, L.E., del Solar, G., Craig, P.O., Espinosa, M., de Mendoza, D. 2004 *Bacillus subtilis* DesR functions as a phosphorylation-activated switch to control membrane lipid fluidity. *J Biol Chem* **279**: 39340-39347.

Da Costa, M.S., Santos, H., Galinski, E.A. 1998. An overview of the role and diversity of compatible solutes in *Bacteria* and *Archaea*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **61**: 117-153.

Delaunay, A.J., Verma, D.P.S. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* **4**: 215-223.

Derzelle, S., Hallet, B., Ferain, T., Delcour, J., Hols, P. 2003. Improved adaptation to cold-shock, stationary-phase, and freezing stresses in *Lactobacillus plantarum* overproducing cold-shock proteins. *Applied and Environmental Microbiol.* **69**: 4285-4290.

Deshnium P., Gombos, Z., Nishiyama, Y., Murata, N. 1996. The action *in vivo* of glycine betaine in enhancement of tolerance of *Synechococcus sp.* strain PCC 7942 to low temperature. *J. Bacteriol.* **179**: 339-344.

Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmidt, R., Bakker, E.P. 1988. Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by threhalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch Microbiol* **150**: 348-357.

Ejsing, C. S., Duchoslav, E., Sampaio, J., Simons, K., Bonner, R., Thiele, C., Ekroos, T., Shevchenko, A. 2006. Automated Identification and Quantification of Glycerophospholipid Molecular Species by Multiple Precursor Ion Scanning. *Anal. Chem.* **78**: 6202-6214.

Ekroos, K., Ejsing, C.S., Bahr, U., Karas, M., Simons, K., Shevchenko, A. 2003. Charting molecular composition of phosphatidylcholines by fatty acid scanning and ion trap MS3 fragmentation. *J. Lipid Res.* **44**: 2181-2192.

Farwick, M., Siewe, R.M., Krämer, R. 1995. Glycine betaine uptake after hyperosmotic shift in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **177**: 4690-4695.

Galinski, E.A., Trüper, H.G. 1994. Microbial behavior in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**: 73-78.

Gerhard, P.N.M., Smith, L.T., Smith, G.M. 1996. Sodium-driven, osmotically activated glycine betaine transport in *Listeria monocytogenes* membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **178**: 6105-6109.

Gerhard, P.N.M., Smith, L.T., Smith, G.M. 2000. Osmotic and chill activation of glycine betaine porter II in *Listeria monocytogenes* membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **182**: 2544-2550.

Glaasker, E., Konings, W.N., Polman, B. 1996. Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **178**: 575-582.

Grill, S., Moll, I., Giuliadori, A.M., Gualerzi, C.O., Bläsi, U. 2002. Temperature-dependent translation of leaderless and canonical mRNAs in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **211**: 161-167.

Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *Escherichia coli*. Seite 109-136. In Glover, D. M. (ed.), DNA cloning, **1**, IRL Press, Oxford.

Haque, M.A., Russell, N.J. 2004. Strains of *Bacillus cereus* vary in the phenotypic adaptation of their membrane lipid composition in response to low water activity, reduced temperature and growth in rice starch. *Microbiology* **150**: 1397-1404.

Hecker, M., Völker, U. 2001. General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv Microbiol Physiol* **44**: 35-91.

Hoischen, C., Krämer, R. 1990. Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **172**: 3409-3416.

Holmström, K.O., Somersalo, S., Mandal, A., Palva, T.E., Welin, B. 2000. Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *J Exp Bot* **51**: 177-185.

Holtmann, G., Bremer E. 2004. Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: involvement of Opu transporters. *J. Bacteriol.* **186**: 1683-1693.

Inaba, M., Suzuki, I., Szalontai, B., Kanesaki, Y., Los, D. A., Hayashi, H., Murata, N. 2002. Gene-engineered rigidification of membrane lipids enhances the cold inducibility of gene expression in *Synechocystis*. *J. Biol. Chem.* **278**: 12191-12198.

Jackson, M., Crick, D.C., Brennan, P.J. 2000. Phosphatidylinositol is an essential phospholipid of *mycobacteria*. *J. Biol. Chem.* **275**: 30092-30099.

Kandror, O., DeLeon, A., Goldberg, A. L. 2002. Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99**: 9727-9732.

Kappes, R. M., Kempf, B., Bremer, E. 1996. Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. *J. Bacteriol.* **178**: 5071-5079.

Kaye, J. Z., Baross, J. A. 2004. Synchronous effects of temperature, hydrostatic pressure, and salinity on growth, phospholipid profiles, and protein patterns of four *Halomonas* species isolated from deep-sea hydrothermal-vent and sea surface environments. *Applied and Environmental Microbiol.* **70**: 6220-6229.

Kemble, A.R., McPherson, H.T. 1954. Liberation of amino acids in perennial rye grass during wilting. *Biochem.* **58**: 46-59.

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

Ko, R., Smith, L.T., Smith, G.M. 1994. Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* **176**: 426-431.

Krämer, R. 1994. Secretion of amino acids by bacteria: Physiology and mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.* **269**: 75-94.

Kuhlmann, A.U. 2002 Biosynthese und Transport des kompatiblen Solutes Ectoin in *Bacillus* spp. Dissertation, Universität Marburg.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature London* **227**: 680-685.

Lambert, C., Erdmann, A., Eikmanns, M., Kramer, R. 1995. Triggering Glutamate Excretion in *Corynebacterium glutamicum* by Modulating the Membrane State with Local Anesthetics and Osmotic Gradients. *Applied and Environmental Microbiol.* **61**: 4334-4342.

Landfald, B., Strøm, A.R. 1986. Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **165**: 849-855.

Le Rudulier, D., Strom, A.R., Dandekar, A.M., Smith, L.T., Valentine, R.C. 1984. Molecular biology of osmoregulation. *Science* **224**: 1064-1068.

- Ley, O. 2001.** Bedeutung der Prolin-Biosynthese bei der Osmoregulation von *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Lippert, K., Galinski, A.A. 1992.** Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 61-65.
- Lipski, A., Altendorf, K. 1997.** Identification of heterotrophic bacteria isolated from ammonia-supplied experiential biofilters. *System. Appl. Microbiol.* **20**: 448-457.
- Mansilla, M.C., Mendoza, D. 2005.** The *Bacillus subtilis* desaturase: a model to understand phospholipid modification and temperature sensing. *Arch Microbiol.* **183**: 229-235.
- Martin, K.L., Smith, T.K. 2005.** The myo-inositol-1-phosphate synthase gene is essential in *Trypanosoma brucei*. *Biochem Soc Trans.* **33**: 983-985.
- Mendum, M.L., Smith L.T. 2001.** Characterization of glycine betaine porter I from *Listeria monocytogenes* and its role in salt and chill tolerance. *Applied and Environmetal Microbiol.* **68**: 813-819.
- Mendum, M.L., Smith L.T. 2002.** Gbu glycine betaine porter and carnitine uptake in osmotically stressed *Listeria monocytogenes* cells. *Applied and Environmetal Microbiol.* **68**: 5647-5655.
- Miller, K.J., Wood, J.M. 1996.** Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 101-136.
- Moe, P.C., Blount, P., Kung, C. 1998.** Functional and structural conservation in the mechanosensitive channel MscL implicates elements crucial for mechanosensation. *Mol. Microbiol.* **28**: 583-592.
- Möker, N. 2002.** Einfluss von Zwei-Komponenten-Systemen auf die Osmoregulation in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Universität zu Köln.

Möker, N., Brocker, M., Schaffer, M., Krämer, R., Morbach, S., Bott, M. 2004. Deletion of the genes encoding the MtrA-MtrB two-component system of *Corynebacterium glutamicum* has a strong influence on cell morphology, antibiotics susceptibility and expression of genes involved in osmoprotection. *Mol. Microbiol.* **54**: 420-438.

Möker, N. 2002. Einfluss von Zwei-Komponenten-Systemen auf die Osmoregulation in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Universität zu Köln.

López, L.S., Alice, A.F., Heras, H., Rivas, E.A., Sánchez-Rivas, C. 2006. Role of anionic phospholipids in the adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *Microbiology* **152**: 605-616.

Nampoothiri, K. M., Hoischen, C., Bathe, B., Mockel, B., Pfefferle, W., Krumbach, K., Sahm, H., Eggeling, L. 2002. Expression of genes of lipid synthesis and altered lipid composition modulates L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**: 89-96.

Neuhaus, K., Francis, K.P., Rapposch, S., Görg, A., Scherer, S. 1999. Pathogenic *Yersinia* species carry a novel, cold-inducible major cold shock protein tandem gene duplication producing both bicistronic and monocistronic mRNA. *J. Bacteriol.* **181**: 6449-6455.

Nichols, D.S., Miller, M.R., Davies, N.W., Goodchild, A., Raftery, M., Cavicchioli, R. 2004. Cold adaptation in the Antarctic Archaeon *Methanococoides burtonii* involves membrane lipid unsaturation. *J. Bacteriol.* **186**: 8508-8515.

Nolden, L. 2001. Mechanismen der Stickstoff-Kontrolle in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Universität zu Köln.

Nottebrock, D., Meyer, U., Krämer, R., Morbach, S. 2003. Molecular and biochemical characterization of mechanosensory channels in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **218**: 305-309.

Nottebrock, D. 2000. Mechanosensitive Kanäle in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Universität zu Köln.

Özcan, N. 2003. Kälteadaptation osmoregulierter Transportsysteme in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Universität zu Köln.

Özcan, N., Krämer, R., Morbach, S. 2005. Chill activation of compatible solute transporters in *Corynebacterium glutamicum* at the level of transport activity. *J. Bacteriol.* **187**: 4752-9.

Peter, H., Bader, A., Burkovski, A., Lambert, C., Krämer, R. 1997. Isolation of the *putP* gene of *Corynebacterium glutamicum* and characterization of a low-affinity uptake system for compatible solutes. *Arch Microbiol.* **168**: 143-151.

Peter, H., Burkovski, A., Krämer, R. 1996. Isolation, characterization, and expression of the *Corynebacterium glutamicum betP* gene, encoding the transport system for the compatible solute glycine betaine. *J. Bacteriol.* **178**: 5229-5234.

Peter, H., Weil, B., 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.

Potts, M. 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev.* **58**: 755-805.

Prasad, R. 1996. *Manual on Membrane Lipids*, Springer, Heidelberg.

Privalov, P.L., Grill, S.J. 1988. Stability of protein structure and hydrophobic interaction. *Adv. Protein Chem.* **39**: 191-234.

Radmacher, E., Alderwick, L.J., Besra, G.S, Brown, A.K., Gibson, K.J., Sahm, H., Eggeling, L. 2005. Two functional FAS-I type fatty acid synthases in *Corynebacterium glutamicum*. *Micobiology* **151**: 2421-2427.

Rajashekar, C.B., Zhou, H., Marcum, K.B., Prakash, O. 1999. Glycine betaine accumulation and induction of cold tolerance in strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) plants. *Plant Science* **148**: 175-183.

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.

Rönsch, H. 2000. Untersuchungen zum Einfluss der Osmoregulation auf die Aminosäureproduktion mit *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Universität zu Köln.

Rübenhagen, R., Rönsch, H., Krämer, R., Morbach, S. 2000. Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* **275**: 735-741.

Rübenhagen, R., Morbach, S., Krämer, R. 2001. The osmoreactive betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* is a sensor for cytoplasmic K⁺. *EMBO J.* **20**: 5412-5420.

Ruffert, S., Berrier, C., Krämer, R., Ghazi, A. 1999. Identification of mechanosensitive ion channels in the cytoplasmic membrane of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **181**: 1673-1676.

Rübenhagen, R., Rönsch, H., Krämer, R., Morbach, S. 2000. Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* **275**: 735-741.

Rübenhagen, R., Morbach, S., Krämer, R. 2001. The osmoreactive betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* is a sensor for cytoplasmic K⁺. *EMBO J.* **20**: 5412-5420.

Rübenhagen, R. 2001. Der Glycinbetain-Transporter BetP aus *Corynebacterium glutamicum* als Osmosensor. Dissertation, Universität zu Köln.

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, D.P., Omar, A.M., Pao, S.S., Paulsen, I.T., Quan, J.A., Sliwinski, M., Tseng, T.T., Wachi, S., Young, G.B. 1999. Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *Biochim. Biophys. Acta* **1422**: 1-56.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

Schaffner, W., Weissmann, C. 1973. A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal Biochem.* **56**: 502-514.

Schweizer, E., Hofmann, J. 2004. Microbial type I fatty acid synthases (FAS): major players in a network of cellular FAS systems. *Microbiol Mol Biol Rev.* **68**: 501-517.

Schiller, D., Krämer, R., Morbach, S. 2004. Cation specificity of osmosensing by the betaine carrier BetP of *Corynebacterium glutamicum*. *Febs Lett.* **563**: 108-112.

Schiller, D., Rübenhagen, R., Krämer, R., Morbach, S. 2004. The C-terminal domain of the betaine carrier BetP of *Corynebacterium glutamicum* is directly involved in sensing K⁺ as an osmotic stimulus. *Biochemistry* **43**: 5583-5591.

Schiller, D., Ott, V., Krämer, R., Morbach, S. 2006. Influence of membrane composition on osmosensing by the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* **281**: 7737-7746.

Schleyer, M., Schmidt, R. und Bakker, E.P., 1993. Transient, specific and extremely rapid release of osmolytes from growing cells of *Escherichia coli* K-12 exposed to hypoosmotic shock. *Arch.Microbiol.* **160**: 424-431.

Smith, L.T. 1996: Role of osmolytes in adaptation of osmotically stresses and chill-stressed *Listeria monocytogenes* grown in liquid media and on processed meat surfaces. *Applied and Environmental Microbiol.* **62**: 3088-3093.

Steger, R. 2002. Vergleichende Studien zur Aktivitätsregulation osmosensitiver Transporter aus *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Universität zu Köln.

Steger, R., Weinand, M., Krämer, K., Morbach, S. 2002. LcoP, an osmoregulated betaine/ectoine uptake system from *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Rev.* **573**: 155-160.

Sukharev, S.I., Blount, P., Kung, C. 1997. Mechanosensitive channels in *Escherichia coli*: the MscL gene, protein, and activities. *Ann. Rev. Physiol.* **59**: 633-657.

Sukharev, S.I., Betanzos, M., Chiang, C.S., Guy, H.R. 2001. The gating mechanism of the large mechanosensitive channel MscL. *Nature.* **409**: 720-724.

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* **76**: 4350-4354.

Tropis, M., Meniche, X., Wolf, A., Gebhardt, H., Strelkov, S., Chamill, M., Schomburg, D., Krämer, R., Morbach, S., Daffé, M. 2005. The crucial role of trehalose and structurally related oligosaccharides in the biosynthesis and transfer of mycolic acids in *Corynebacterineae*. *J. Biol. Chem.* **280**: 26573-26585.

Tsatskis, Y., Khambati, J., Dobson, M., Bogdanov, M., Dowhan, W., Wood, J.M. 2005. The osmotic activation of transporter ProP is tuned by both its C-terminal coiled-coil and osmotically induced changes in phospholipid composition. *J. Biol. Chem.* **280**: 41387-41394.

Tzvetkov, M., Klopprogge, C., Zelder, O., Liebl, W. 2003. Genetic dissection of trehalose biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*: inactivation of trehalose production leads to impaired growth and an altered cell wall lipid composition. *Micobiology* **149**: 1659-1673.

van der Heide, T., Poolman, B. 2000a. Osmoregulated ABC transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7102-7106.

van der Heide, T., Poolman, B. 2000b. Glycine betaine transport in *Lactococcus lactis* is osmotically regulated at the level of expression and translocation activity. *J. Bacteriol* **182**, 203-206.

van der Heide, T., Stuart, M.C., Poolman, B. 2001. On the osmotic signal and osmosensing mechanism of an ABC transport system for glycine betaine. *EMBO J.* **20**: 7022-7032.

Weber, M.H., Marahiel M. 2003. Bacterial cold shock responses. *Science Progress* **86**: 9-75.

Wemekamp-Kamphuis, H.H., Sleator, R.D., Wouters, J.A., Hill, C., Abee, T. 2004. Molecular and physiological analysis of the role of osmolyte transporters BetL, Gbu, and OpuC in growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiol.* **70**: 2912-2918.

Wolf, A. 2002. Trehalosesynthese in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Universität zu Köln.

Wolf, A., Krämer, R., Morbach, S. 2003. Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and their significance in response to osmotic stress. *Molecular Microbiol.* **49**: 1119-1134.

Wood, J.M. 1999. Osmosensing in bacteria: signals and membrane based sensors. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **63**: 230-262.

Wood, J.M., Bremer, E., Csonka, L.N., Krämer, R., Poolmann, B., van der Heide, T., Smith, L.T. 2001. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **130**: 437-460.

Xing, W., Rajashekar, C.B. 2001. Glycine betaine involvement in freezing tolerance and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Environ Exp. Bot.* **46**: 21-28.

Ziegler, C., Morbach, S., Schiller, D., Krämer, R., Tziatzios, C., Schubert, D., Kühlbrandt, W. 2004. Projection structure and oligomeric state of the osmoregulated sodium/glycine betaine symporter BetP of *Corynebacterium glutamicum*. *J Mol Biol* **337**: 1137-47.

Zhu, K., Ding, X., Julotok, M., Wilkinson, B.J. 2005. Exogenous isoleucine and fatty acid shortening ensure the high content of anteiso-C15:0 fatty acid required for low-temperature growth of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8002-7.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer danke herzlich für das interessante Arbeitsthema sowie seine stete Diskussionsbereitschaft, seine Unterstützung und sein fortwährendes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Frau Dr. Susanne Morbach danke ich für die vielen Ratschläge und die außerordentliche Betreuung und das immer freundliche Arbeitsklima.

Hr. Dr. Andre Lipksi (Uni Osnabrück) danke ich für richtungsweisenden GC-Analysen.

Bei meinen Kooperationspartner Christer Ejsing (MPI, Dresden) möchte ich mich für die abwechslungsreiche Zusammenarbeit, für die MS Analysen sowie die Dresden-Tour bedanken.

Marlene Stein (Uni Bonn) sei herzlich gedankt für die spontane Unterstützung bei den HPLC-Proben.

Ching-Ju Tsai (MPI, Frankfurt) danke ich für die Unterstützung bei ersten Einblicken in die Welt der Lipidextraktion inklusive Ethererfahrung.

Meinen Kollegen und Ehemaligen danke ich für die schöne Zeit und zusätzlich:

Dirk, Astrid und Jusch für das nette und sehr unkomplizierte Klima im kleinen Lab „ohne meins und deins“, Astrid für eigenartigen Witz und Charme, Philipp für die einzigartigen Läufe, Vera und Sascha für den regen Pufferbasar, Kay für die immer spontane Unterstützung, Martin für die vielen netten Nettigkeiten, Julia für's Korrekturlesen, Jeannine für den Montagssport, Britta und Alja für die zuverlässige Dokumenten-Transferleistung Köln-Erlangen, sowie Marc, Anja, Bettine, Eva, Gabi, Marit, Nina, Tobi, Ute, Uwe Otto sowie meinen Praktikanten Astrid, Christian und Alex.

Besonders möchte ich mich bei Christian, Steffi, Sibel und Semra bedanken.

Der größte Dank gilt meinen Eltern.

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 am Institut für Biochemie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln betreut worden.

Teilpublikationen:

Özcan, N., Krämer, R., Morbach, S. 2005. Chill activation of compatible solute transporters in *Corynebacterium glutamicum* at the level of transport activity. *J. Bacteriol.* **187**: 4752-9.

Özcan, N., Ejsing, C.S., Shevchenko, A., Lipski, A., Morbach, S., Krämer, R. 2006. Activity modulation of the betaine transporter BetP from *Corynebacterium glutamicum* by changes in osmolality, temperature and lipid surrounding. *In Vorbereitung.*

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.

Datum: Köln, Dezember 2006

Unterschrift:

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Nuran Özcan
Geburtsdatum, -ort: 20.06.1976, Siegen
Anschrift: Gustavstr. 43, 50937 Köln
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1984 - 1988 Grundschole Kredenbach, Kreuztal
1988 - 1996 Friedrich-Flick-Gymnasium, Kreuztal
Abschluss: Abitur

Hochschulbildung:

04/1997 - 03/1998 Studium der Betriebswirtschaftslehre
Philipps-Universität Marburg
04/1998 - 09/2001 Studium der Biologie
J. Gutenberg-Universität Mainz
Abschluss: Vordiplom
10/2001 - 10/2003 Studium der Biologie an der Universität zu Köln
Abschluss: Diplom
01/2004 - 02/2007 Promotion am Institut für Biochemie der Universität zu Köln
Arbeitsgruppe Herr Prof. Dr. R. Krämer

Fortbildungen/ Praktika:

06/1996 – 07/1997 Betriebspraktikum im
Unternehmen Eisenbau Krämer, Kreuztal
01/1997 Betriebspraktikum im
Unternehmen Kurvers International Supply Services Ltd.,
London, Grossbritannien
07/2001 Praktikum am Institut für Biologische Informations-
verarbeitung 1, Forschungszentrum Jülich
02/2000 – 03/2000 Neuere Methoden der Molekularbiologie und Molekulargenetik
J. Gutenberg-Universität Mainz
10/2004 Fachkunde Strahlenschutz, Strahlenschutzverordnung
StrlSchV: Fachkundegruppe 2.2/4.1/4.2

