

Der Glycinbetain-Transporter BetP aus
Corynebacterium glutamicum
als Osmosensor

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln
vorgelegt von

René Rübenhagen
aus Bremen

Köln, Juni 2001

Betreuung und 1. Referent: Prof. Dr. R. Krämer, Lehrstuhl für Biochemie der Universität zu Köln

2. Referent: Prof. Dr. U.-I. Flügge, Lehrstuhl für Botanik II der Universität zu Köln

Tag der Disputation: 26. Juni 2001

Der Glycinbetain-Transporter BetP aus *Corynebacterium glutamicum* als Osmosensor

Unter hyperosmotischen Bedingungen transportiert der Glycinbetain-Transporter BetP aus *Corynebacterium glutamicum* im Symport mit zwei Na⁺-Ionen Glycinbetain in die Zelle. Glycinbetain ist ein kompatibles Solut, das auch in hohen cytoplasmatischen Konzentrationen zelluläre Funktionen nicht beeinflusst und somit ideal geeignet, durch Akkumulation im Zellinneren die Zelle vor einem Wasserverlust zu schützen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Reiz ermittelt, der unter hyperosmotischen Bedingungen die Aktivierung von BetP verursacht. Durch einen hyperosmotischen Schock erhöht sich die Membranspannung der Cytoplasmamembran sowie die Osmolalität, Ionenstärke und Solut-Konzentration des die Zelle umgebenden Mediums und des Cytoplasmas. Um die Frage nach dem BetP-aktivierenden Reiz zu klären, wurde BetP isoliert, in *E. coli*-Phospholipid-Liposomen rekonstituiert und in den resultierenden Proteoliposomen charakterisiert, wobei BetP in diesem reduzierten System die gleichen osmosensorischen und osmoregulatorischen Eigenschaften aufwies wie im zellulären System. Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung von BetP weder durch eine Erhöhung der Membranspannung noch durch Veränderungen der externen Bedingungen noch durch die absolute interne Osmolalität oder Ionenstärke sondern ausschließlich durch die zum jeweiligen Zeitpunkt vorliegende interne Konzentration an K⁺- oder K⁺-ähnlicher Ionen bestimmt wird. Zudem wurden Hinweise gefunden, dass die nun vorliegende Modellvorstellung der Aktivierung von BetP durch die interne K⁺-Konzentration auch auf die Situation in Zellen übertragbar ist.

The Betaine Carrier BetP of *Corynebacterium glutamicum* as Osmosensor

Under hyperosmotic conditions the betaine carrier BetP of *Corynebacterium glutamicum* transports betaine in symport with two sodium ions into the cell. Betaine is a compatible solute that even in high cytoplasmic concentrations does not interfere with cellular functions and is therefore an ideal candidate to protect the cell against dehydration by internal accumulation. In this thesis the actual stimulus was determined which under hyperosmotic conditions causes the activation of BetP. By a hyperosmotic shock the membrane strain of the cytoplasmic membrane is changed as well as the osmolality, ionic strength and solute concentration of the surrounding medium and of the cytoplasm. To answer the question which stimulus activates BetP, BetP was isolated, reconstituted into *E. coli* phospholipid liposomes and characterized in the resulting proteoliposomes. In this reduced system BetP showed the same osmosensing and osmoregulatory characteristics as in cells. It was shown that activation of BetP is neither determined by an increase of membrane strain nor by a change of the external conditions nor by the absolute internal osmolality or ionic strength but only by the internal concentration of potassium or potassium-like ions. In addition, hints were found that the new concept of BetP activation by the internal potassium concentration may also be correct for the situation in intact cells.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	1
1.2	Osmotische Eigenschaften von Zellen.....	2
1.3	Osmoregulation unter hypoosmotischen Bedingungen.....	3
1.4	Osmoregulation unter hyperosmotischen Bedingungen	3
1.5	Der Glycinbetain-Transporter BetP aus <i>C. glutamicum</i>	6
1.6	Mögliche Reize zur Wahrnehmung von hyperosmotischem Stress	8
1.7	Vorteile des Proteoliposomen-Systems	9
1.8	Ziel der Arbeit.....	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen.....	12
2.2	Bakterienstämme und Plasmide	12
2.3	Molekularbiologische Methoden	13
2.3.1	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	13
2.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	14
2.3.3	Ortsgerichtete Mutagenese	14
2.3.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	16
2.3.5	Restriktion, Modifikation und Ligation von DNA	16
2.3.6	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Stämmen	16
2.3.6.1	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> DH5 α mcr-Stämmen	16
2.3.6.2	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> MKH13-Stämmen.....	17
2.3.7	Sequenzierung von DNA und Sequenzanalyse	17
2.4	Allgemeine analytische Methoden.....	18
2.4.1	Protein-Konzentrationsbestimmungen.....	18
2.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	18
2.4.3	Westernblot-Analyse	18
2.4.4	Bestimmung der Osmolalität	19
2.4.5	Bestimmung der internen K ⁺ -Konzentration	19

2.5	Biochemische Methoden.....	20
2.5.1	Membranpräparation.....	20
2.5.2	Isolierung von Strep-BetP mit der StrepTactin [®] -Affinitätschromatographie.....	20
2.5.3	Präparation von Liposomen.....	21
2.5.4	Trübungsmessung.....	21
2.5.5	Rekonstitution von Strep-BetP in Liposomen.....	22
2.5.6	Synthese von ¹⁴ C-Glycinbetain.....	22
2.5.7	Radiochemische Transportmessungen.....	23
2.5.7.1	Messungen der Glycinbetain-Aufnahme in Proteoliposomen.....	23
2.5.7.2	Messungen der Glycinbetain-Aufnahme in <i>E. coli</i> -Zellen.....	23
2.5.7.3	Messungen der Substrat-Aufnahme in <i>E. coli</i> -Zellen unter K ⁺ -limitierenden Bedingungen.....	24
2.5.8	Bestimmung der Topologie von BetP.....	25
2.5.8.1	Bestimmung der Lokalisation der Extensionen von BetP durch ELISA.....	25
2.5.8.2	Messung der Zugänglichkeit der „Einzelsystein-BetP-Proteine“ für thioispezifische Reagenzien in Zellen und invertierten Membranvesikeln.....	26
2.5.8.3	Messung der Zugänglichkeit der „Einzelsystein-BetP-Proteine“ für thioispezifische Reagenzien in Proteoliposomen.....	27
2.5.8.4	Immunologische Zugänglichkeit von Strep-tagII in Proteoliposomen mit ELISA.....	27
3	Ergebnisse.....	28
3.1	Optimierung der Expression, Reinigung und Rekonstitution von Strep-BetP.....	28
3.1.1	Heterologe Expression von Strep-BetP in <i>E. coli</i> DH5 α mc ^r	28
3.1.2	Optimierung der Reinigung von Strep-BetP mit der StrepTactin-Affinitätschromatographie.....	29
3.1.3	Optimierung der Rekonstitution von Strep-BetP in <i>E. coli</i> -Liposomen.....	31
3.2	Charakterisierung von Strep-BetP in Proteoliposomen.....	32
3.2.1	Glycinbetainaufnahme und Transportspezifität von Strep-BetP in Proteoliposomen.....	32
3.2.2	K _M ⁻ und V _{max} -Werte für Glycinbetain und Na ⁺ in Proteoliposomen.....	33
3.2.3	Abhängigkeit der Transportaktivität vom chemischen und elektrischen Potenzial.....	34
3.2.4	Einfluss der externen Osmolalität auf die Aktivitätsregulation von BetP.....	36
3.3	Eingrenzung der möglichen BetP-aktivierenden Reize.....	37
3.3.1	Einfluss der Volumenverringerng der Proteoliposomen.....	37
3.3.2	Einfluss der externen Osmolalität <i>per se</i>	39
3.3.3	Einfluss der internen Osmolalität.....	40
3.3.4	Einfluss verschiedener interner Solute.....	42
3.3.5	Einfluss unterschiedlicher interner Kationen.....	43

3.4	Abhängigkeit der BetP-Aktivität in <i>E. coli</i>-Zellen von der internen K^+-Konzentration.....	46
3.4.1	Substrataufnahme durch osmotisch unterschiedlich behandelte Zellen	46
3.4.2	GB-Aufnahmemessungen mit isoosmolal gewaschenen <i>E. coli</i> -Zellen	47
3.5	Einfluss der Membranumgebung auf die Osmoregulation von BetP	49
3.5.1	Einfluss der Phospholipidzusammensetzung der Proteoliposomen.....	49
3.5.2	Einfluss von Tetracain auf die Aktivität von BetP in Proteoliposomen	52
3.6	Orientierung von Strep-BetP in Zellen und Proteoliposomen.....	54
3.6.1	Orientierung von Strep-BetP in <i>E. coli</i> -Zellen	54
3.6.1.1	Bestimmung der Lokalisation der Extensionen von BetP durch ELISA	54
3.6.1.2	Konstruktion der Gene des cysteinfreien BetP-Proteins und der „Einzelsystein-BetP-Proteine“	56
3.6.1.3	Bestimmung der Lokalisation der ersten und letzten Schleife von BetP.....	57
3.6.2	Orientierung von Strep-BetP in Proteoliposomen	58
3.6.2.1	Bestimmung der Zugänglichkeit der „Einzelsystein-BetP-Proteine“ für thiol-spezifische Reagenzien... 58	58
3.6.2.2	Untersuchung der Orientierung von Strep-BetP durch ELISA	59
3.7	Kinetische Eigenschaften von verschiedenen MKH13-Stämmen	61
3.7.1	Einfluss eines N- bzw. C-terminalen Strep-tagII.....	61
3.7.2	GB-Aufnahmeraten von „Einzelsystein-Mutanten“	62
3.7.3	Einfluss von Verkürzungen des C-Terminus auf die GB-Aufnahme	63
4	Diskussion	64
4.1	Charakterisierung von BetP in Proteoliposomen	64
4.2	Welcher Reiz wird von BetP wahrgenommen ?	66
4.3	Übertragung der Ergebnisse auf die Situation in Zellen	71
4.4	Einflüsse der Membranumgebung	73
4.5	Untersuchungen zur Orientierung von BetP.....	74
4.6	Ein Blick in die Zukunft.....	77
5	Zusammenfassung	79
6	Anhang	81
6.1	BetP-Nukleotidsequenz in pASK-IBA5- <i>betP</i>	81
6.2	Vorhersage der Transmembrandomänen von BetP.....	82
6.3	BetP-Alignment mit anderen Mitgliedern der BCCT-Familie.....	83
6.4	Vergleich von BetP mit anderen Mitgliedern der BCCT-Familie	84
7	Literatur.....	85

Abkürzungen

AHT	Anhydrotetracyclin
AP	Alkalische Phosphatase
Amp ^R	Resistenz gegen Ampicillin
AS	Aminosäure
ATCC	American type culture collection
atm	Atmosphärendruck
BCCT-Familie	Betain-Cholin-Carnitin-Transporter-Familie
BCIP/NBT	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat / Nitro-Blau-Tetrazolium
BM	3-(N-Maleimidylpropionyl)-Biocytin
BSA	Rinderserumalbumin
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPG	Diphosphatidylglycerin (Cardiolipin)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	‘enzyme-linked immunosorbent assay‘
GB	Glycinbetain
HABA	4-Hydroxy-Azobenzon-2-Carboxylsäure
kDa	Kilo-Dalton
KGlu	Kalium-Glutamat
K _M	Michaelis-Konstante
KP _i	Kalium-Phosphat-Puffer
LB-Medium	Luria Bertani – Medium
LPR	Lipid-Protein-Verhältnis
Mes	Morpholinoethansulfonsäure
mosm	mmol/kg bzw. mosmol/kg
NaP _i	Natrium-Phosphat-Puffer
osm	mol/kg bzw. osmol/kg

Abkürzungen

PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglycol
PG	Phosphatidylglycerin
PHDThtm	Topologievorhersage von TMDs (<u>h</u> elical <u>t</u> rans <u>m</u> embrane regions) mit dem 'Profile fed neural network system from <u>H</u> ei <u>D</u> elberg'
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RBS	Ribosomenbindestelle
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SM	4-Acetamino-4'-maleimidylstilben-2,2'-disulfonat
<i>tetA</i>	Tetracyclin-Resistenzgen
TG	Trockengewicht
TMD	Transmembrandomäne
Tris	2-Amino-Hydroxymethylpropan-1,3-Diol
ÜN-Kultur	Übernacht-Kultur
Upm	Umdrehungen pro Minute
V_{\max}	Maximalgeschwindigkeit

Bemerkungen

Um die osmotische Stärke einer Lösung zu beschreiben, wird in der vorliegenden Arbeit der Begriff „Osmolalität“ verwendet. Osmolalität beschreibt den osmotischen Druck einer Lösung in mol bzw. osmol gelöste Solute pro kg Lösung (kurz: osm). Demgegenüber beschreibt die „Osmolarität“, wieviel mol Solute pro Liter Lösung gelöst sind (kurz: osM). Während die Osmolarität berechnet aber nicht gemessen werden kann, kann die Osmolalität gemessen aber nicht berechnet werden. Die Osmolalität kann nicht berechnet werden, weil sie nicht nur durch die definierte Zahl der gelösten Solute in der Lösung beschrieben wird, sondern auch durch deren Größe, Form und Ladung (Sweeney & Beuchat, 1993). In den meisten Fällen ist die Osmolarität einer wässrigen Lösung jedoch eine gute Annäherung zur Osmolalität.

Die vorliegende Arbeit wurde nach der seit dem 1. August 1998 gültigen Rechtschreibung verfasst.

1 Einleitung

Die meisten auf der Welt existierenden Organismen oder zumindest Teile von ihnen sind im Laufe ihres Lebens sehr unterschiedlichen osmotischen Bedingungen ausgesetzt. Sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Organismen haben Strategien entwickelt, um zu verhindern, dass ihre Zellen bei wechselnden osmotischen Bedingungen platzen oder austrocknen. Um unter hypoosmotischen Bedingungen zu verhindern, dass Zellen platzen, lassen diese Ionen oder niedermolekulare Substanzen aus dem Zellinneren nach außen strömen. Unter hyperosmotischen Bedingungen dagegen nehmen Zellen osmoprotektive Solute auf bzw. synthetisieren diese. Damit Zellen die beschriebenen Mechanismen anwenden können, müssen sie zwei Fähigkeiten besitzen: 1. Reizwahrnehmung des hypo- bzw. hyperosmotischen Stresses (Osmostresswahrnehmung) und 2. Vermittlung des Reizes zur Expression osmotisch regulierter Gene und zur Aktivierung osmotisch regulierter Proteine (Osmoregulation).

1.1 *Corynebacterium glutamicum*

Corynebacterium glutamicum (früher *Micrococcus glutamicum*) wurde 1957 von Kinoshita *et al.* isoliert und charakterisiert. Phylogenetisch gehört die Gattung *Corynebacterium* innerhalb der Gram-positiven Bakterien zur Untergruppe mit hohem GC-Gehalt. Diese umfasst neben der großen Gruppe der filamentösen Actinomyceten u.a. auch Propionsäurebakterien und coryneforme Bakterien (Madigan *et al.*, 1997). Coryneforme Bakterien haben eine stäbchen- bzw. keulenförmige (coryneforme) Gestalt, sind aerob und unbeweglich, bilden keine Sporen aus und zeichnen sich durch eine „schnappende“ Zellteilung aus, d.h. die Zellen bleiben kurz vor der eigentlichen Teilung noch seitlich miteinander verbunden. Zur Gattung *Corynebacterium* zählen neben Bodenbakterien auch humanpathogene Arten wie z.B. *C. diphtheriae* und pflanzenpathogene Arten wie z.B. *C. michiganense* und *C. fascians*. *C. glutamicum* ist dagegen ein apathogenes Bodenbakterium und zeichnet sich dadurch aus, dass es Aminosäuren, wie z.B. Glutamat und Lysin in die Umgebung exkretiert. Daher hat *C. glutamicum* eine hohe biotechnologische und industrielle Bedeutung, da Glutamat als Geschmacksverstärker in der Lebensmittelindustrie und Lysin als Futtermitteladditiv in der Tiermasthaltung verwendet wird. Die weltweite jährliche Produktion der beiden wichtigsten durch *C. glutamicum* fermentativ hergestellten Aminosäuren beträgt zur Zeit 1.000.000 Tonnen L-Glutamat und 350.000 Tonnen L-Lysin (Krämer, persönliche Mitteilung).

1.2 Osmotische Eigenschaften von Zellen

Bakterien- und Pflanzenzellen sind darauf angewiesen, dass das Zellvolumen und der Zell-turgordruck, d.h. der Druck, den die Cytoplasmamembran gegen die Zellwand aufbaut, aufrecht erhalten wird. Ein zu hoher Turgordruck führt zum Bersten der Zelle, ein zu niedriger Turgordruck beeinträchtigt den Metabolismus der Zelle und verhindert, dass sich die Zelle teilen kann (Kempf & Bremer, 1998). Der Turgordruck von Gram-negativen Bakterien beträgt 1-5 atm, der von Gram-positiven Bakterien 15-25 atm (Poolman & Glaasker, 1998).

Erniedrigt sich die Osmolalität des die Zelle umgebenden Mediums wird die Zelle hypo-osmotisch gestresst, erhöht sich die Osmolalität wird sie hyperosmotisch gestresst. Aufgrund der Semipermeabilität der Zellmembran folgt den beschriebenen Bedingungen ein Wassereinstrom in die Zelle hinein bzw. ein Wasserausstrom aus der Zelle heraus. Mathematisch lässt sich dieser Sachverhalt folgendermaßen beschreiben: Mit steigender Osmolalität sinkt das Wasserpotenzial ($\Psi_w =$ Potenzial des Lösungsmittels) einer Lösung, während das osmotische Potenzial ($\Psi_\pi =$ Potenzial der gelösten Solute, zum Wasserpotenzial komplementär) steigt. Bei geeigneter Verdünnung ergibt sich nach Van't Hoff für das osmotische Potenzial folgende vereinfachte Beziehung:

$$\Psi_\pi = R \cdot T \cdot \Sigma C$$

wobei R die allgemeine Gaskonstante, T die absolute Temperatur und C die Konzentration der gelösten Teilchen darstellt. Da unter physiologischen Bedingungen die zellinterne Osmolalität höher ist als die externe Osmolalität, wirkt der oben beschriebene Turgordruck dem einströmenden Wasser entgegen. Demnach erfolgt kein Wasserstrom, wenn sich Turgordruckpotenzial (Ψ_p) und osmotisches Potenzial ausgleichen:

$$\Psi_w = \Psi_\pi + \Psi_p ;$$

wenn $\Psi_\pi = \Psi_p$, dann $\Psi_w = 0$.

Zellen sind in der Lage, unter verschiedenen osmotischen Bedingungen das Zellvolumen und den Zellturgordruck zu regulieren. Dabei wird zwischen der Osmoregulation bei hypoosmotischem und hyperosmotischem Stress unterschieden.

1.3 Osmoregulation unter hypoosmotischen Bedingungen

Sinkt die Osmolalität des umgebenen Mediums, sind Bakterien einem hypoosmotischen Stress ausgesetzt. Dies führt zu einem Wassereinstrom in die Zelle, der abhängig vom Potenzialgefälle sehr massiv sein kann. Um den drohenden Zellvolumenanstieg, der das Bersten der Zelle zur Folge hätte, zu verhindern, schleust die Zelle Ionen und niedermolekulare Substanzen aus, so dass das osmotische Potenzial innerhalb der Zelle erniedrigt wird. Der diesbezüglich am besten untersuchte Organismus ist *Escherichia coli*. Unter hypoosmotischen Bedingungen schleust *E. coli* relativ unspezifisch Solute aus, hält jedoch Solute wie z.B. Alanin, Lysin, Arginin und Sucrose vollständig zurück (Schleyer *et al.*, 1993). In *C. glutamicum* ist der Efflux von z.B. K^+ -Ionen und Glutamat unter hypoosmotischen Bedingungen gering und stattdessen findet ein sehr spezifischer Efflux der kompatiblen Solute Glycinbetain und Prolin statt (Ruffert *et al.*, 1997). Kompatible Solute sind organische Moleküle, die auch in sehr hohen cytoplasmatischen Konzentrationen die zellulären Funktionen, im speziellen die Enzymaktivitäten, nicht beeinflussen und daher für die Osmoregulation der Zelle besonders gut geeignet sind (Yancey *et al.*, 1982; Wood, 1999).

Sowohl in *E. coli* als auch in *C. glutamicum* wird die Exkretion zellinterner Solute durch mechanosensitive Kanäle vermittelt, die unter hypoosmotischen Stressbedingungen durch Veränderungen der Membranspannung geöffnet und damit aktiviert werden (Berrier *et al.*, 1992). In *E. coli* sind drei Gruppen von mechanosensitiven Kanälen beschrieben, die sich in Bezug auf die Größe ihrer Leitfähigkeit unterscheiden (Berrier *et al.*, 1996). Auch in *C. glutamicum* sind zwei mechanosensitive Kanäle charakterisiert worden, denen der spezifische Efflux von Glycinbetain und Prolin sowie ein geringer Efflux von Kationen zugeschrieben werden (Ruffert *et al.*, 1997; Ruffert *et al.*, 1999; Nottebrock, 2000).

1.4 Osmoregulation unter hyperosmotischen Bedingungen

Bakterien sind einem hyperosmotischen Stress ausgesetzt, wenn die Osmolalität des umgebenen Mediums steigt und so dessen Wasserpotenzial sinkt. Die Folge wäre ein massiver Wasserausstrom aus der Zelle, wenn die Zelle nicht geeignete Schutzmechanismen entwickelt hätte. Da Proteine für ihre Funktion eine Hydrathülle benötigen, würde ein hoher Wasserverlust der Zelle den Metabolismus beeinträchtigen sowie das Wachstum und die Teilung der Zelle verhindern (Wiggins, 1990; Wood, 1999). Die Zelle schützt sich vor einem Wasserverlust, indem sie als unmittelbare Reaktion auf einen hyperosmotischen Stress

K⁺-Ionen und/oder kompatible Solute aufnimmt, wobei das unter Bakterien am weitesten verbreitete kompatible Solut Glycinbetain ist. Darüberhinaus sind die meisten Organismen auch in der Lage, kompatible Solute zu synthetisieren. Die Osmostressantwort einiger halophiler Archaea beschränkt sich darauf, bis zu 5 M KCl in der Zelle zu akkumulieren (Martin *et al.*, 1999).

Am besten untersucht ist die Osmoregulation in *E. coli*. Unter hyperosmotischen Stressbedingungen nimmt *E. coli* in einer ersten schnellen Osmostressantwort K⁺-Ionen auf, akkumuliert im Cytoplasma Glutamat als K⁺-Gegenion und schleust Protonen und Putrescin aus der Zelle (Munro *et al.*, 1972; Epstein, 1986; Dinnbier *et al.*, 1988). In einer zweiten Phase ersetzt die Zelle einen Großteil der eingeschleusten K⁺-Ionen, indem kompatible Solute, wie z.B. Glycinbetain, Prolin und Ectoin (Abbildung 1) aus der Umgebung aufgenommen werden. Weitere

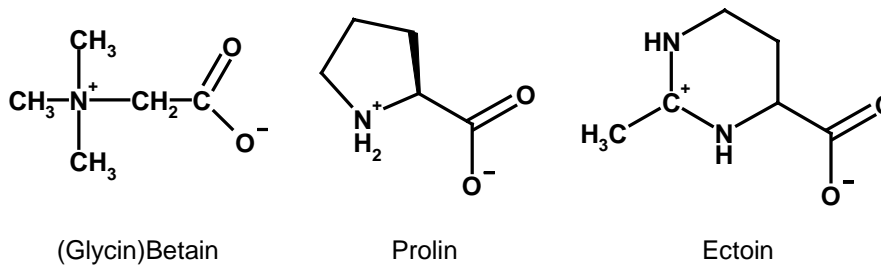


Abbildung 1: Beispiele kompatibler Solute. Die abgebildeten kompatiblen Solute können von *C. glutamicum* bei hyperosmotischem Stress aufgenommen werden.

von *E. coli* aufgenommene kompatible Solute sind Prolinbetain, Taurin und Cholin, wobei letzteres in der Zelle zu Glycinbetain umgewandelt wird (Grothe *et al.*, 1986; Sutherland *et al.*, 1987; Csonka, 1989). In dieser Phase werden außerdem osmoreguliert Gene wie z.B. *proP*, *proU*, *kdpFABC* und *betT* exprimiert. Wenn der Zelle kein Glycinbetain oder Prolin zur Verfügung steht, ist *E. coli* außerdem in der Lage, Trehalose als osmoprotektive Substanz *de novo* zu synthetisieren (Dinnbier *et al.*, 1988; Strøm & Kaasen, 1993). Der bezüglich der zellulären Osmostressantwort am besten untersuchte Gram-positive Organismus ist *Bacillus subtilis* (Kappes *et al.*, 1996; Kappes & Bremer, 1998; Kempf & Bremer, 1998). *B. subtilis* zeichnet sich dadurch aus, ein breites Spektrum an kompatiblen Soluten aufnehmen zu können. Die Aufnahme mindestens zwölf verschiedener osmoprotektiver Substanzen erfolgt durch fünf unterschiedliche Aufnahmesysteme, die sich stark bezüglich ihrer Substratspezifität unterscheiden. Drei der Transporter gehören der Klasse der ABC-Transporter an, während zwei zu den sekundären Transportern zählen. Der sekundäre Na⁺/Glycinbetain-Transporter OpuD weist eine hohe Ähnlichkeit zu BetP aus *C. glutamicum* auf.

Wird *C. glutamicum* einem hyperosmotischen Stress ausgesetzt, werden, falls vorhanden, die kompatiblen Solute Glycinbetain, Ectoin und Prolin aus der Umgebung aufgenommen. Außerdem ist *C. glutamicum* unter hyperosmotischen Bedingungen in der Lage, Prolin und Trehalose zu synthetisieren, um so das osmotische Gleichgewicht der Zelle aufrecht zu erhalten. Während Prolin nur in der Wachstumsphase synthetisiert wird, wird Trehalose vorwiegend in der stationären Phase synthetisiert. Die Zelle synthetisiert erheblich weniger Prolin, wenn der Zelle externes Glycinbetain zur Verfügung steht (Rönsch, 2000). Die osmoregulierte Aufnahme von kompatiblen Soluten, die gegenüber deren Synthese bevorzugt wird, wird durch vier Aufnahmesysteme vermittelt (Abbildung 2). Die sekundären Trans-

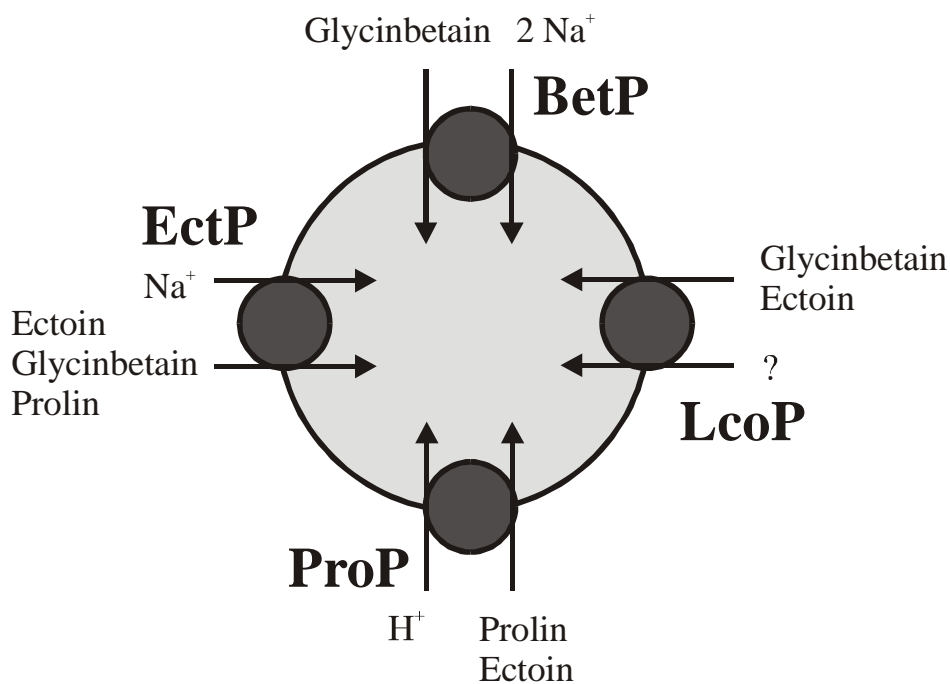


Abbildung 2: Osmoregulierte Transportproteine in *C. glutamicum*. Die abgebildeten sekundären Transportsysteme nehmen unter hyperosmotischen Bedingungen kompatible Solute auf. Die Spezifität für die Substrate und das Cosubstrat sind abgebildet. Die Substratspezifität von LcoP ist erst teilweise charakterisiert.

porter BetP, EctP und ProP und wahrscheinlich auch der erst kürzlich entdeckte Transporter LcoP (vorläufige Bezeichnung; Steger, persönliche Mitteilung) nehmen kompatible Solute im Symport mit Ionen auf. Die Spezifität der Transporter ist dabei sehr unterschiedlich. Während BetP sehr spezifisch Glycinbetain transportiert, weisen EctP und ProP eine niedrigere Substratspezifität auf, können aber mehrere kompatible Solute aufnehmen. EctP transportiert sowohl Ectoin als auch Glycinbetain und Prolin, während ProP spezifisch für Prolin und Ectoin ist (Peter *et al.*, 1996; Peter *et al.*, 1998b). LcoP ist noch nicht näher charakterisiert,

jedoch ist bereits bekannt, dass dieser Transporter Glycinbetain, Ectoin und möglicherweise auch weitere kompatible Solute transportiert; außerdem gehört LcoP genauso wie BetP und EctP zur Betain/Cholin/Carnitin-Transporterfamilie (Anhang 4). Nachdem die beschriebenen vier Transporter sowie das osmotisch nicht regulierte Aufnahmesystem für Prolin PutP in *C. glutamicum* deletiert wurden, konnte keine Aufnahme kompatibler Solute mehr nachgewiesen werden (Steger, persönliche Mitteilung). Dies spricht dafür, dass keine weiteren osmoregulierten Aufnahmesysteme für kompatible Solute in *C. glutamicum* existieren.

1.5 Der Glycinbetain-Transporter BetP aus *C. glutamicum*

Es wurde gezeigt, dass *C. glutamicum* Glycinbetain im Symport mit zwei Na⁺-Ionen aufnimmt, wobei der Transport über ein hochaffines sekundäres Transportsystem vermittelt wird (Farwick *et al.*, 1995). Anschließend wurde ein Gen aus *C. glutamicum* isoliert, das sequenziert sowie molekularbiologisch und biochemisch untersucht wurde (Peter *et al.*, 1996). Die Untersuchungen zeigten, dass das isolierte Gen den beschriebenen Na⁺/Glycinbetain-Transporter codiert, weshalb das Genprodukt BetP (Betain-Permease) genannt wurde. Laut Computer-Topologievorhersage (Rost *et al.*, 1995) besteht BetP aus zwölf Transmembrandomänen, die durch externe bzw. cytoplasmatische Schleifen miteinander verbunden sind, sowie einer N- und C-terminalen Extension (Abbildung 3). BetP besteht aus 595 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 64,2 kDa. Der K_M-Wert für Na⁺ liegt bei 4,1 mM, der für Glycinbetain bei 8,6 µM, während die maximale Aufnahmerate bei 110 nmol Glycinbetain/(min*mg Zelltrockengewicht) liegt (Peter *et al.*, 1996). Außerdem kann die Zelle durch BetP Glycinbetain bis zu einem extrem hohen Gradienten von 4*10⁶ (in/ex) akkumulieren (Farwick *et al.*, 1995). Neben der Regulation auf Aktivitätsebene (s.u.) wird BetP auch auf Expressionsebene reguliert. BetP wird zwar auf einem Basallevel konstitutiv exprimiert, ist aber durch hyperosmotische Bedingungen mindestens 20-fach induzierbar (Farwick *et al.*, 1995; Krämer, persönliche Mitteilung). Die Regulation auf Aktivitätsebene kann durch Variation der extern vorliegenden Osmolalität untersucht werden. Messungen in *C. glutamicum* zeigten, dass BetP ohne Zugabe von osmotisch wirksamen Substanzen zum externen Medium nicht aktiviert wird, während eine Erhöhung der extern vorliegenden NaCl- bzw. Sorbitol-Konzentration zu einer Glycinbetainaufnahme durch BetP führt (Peter *et al.*, 1996).

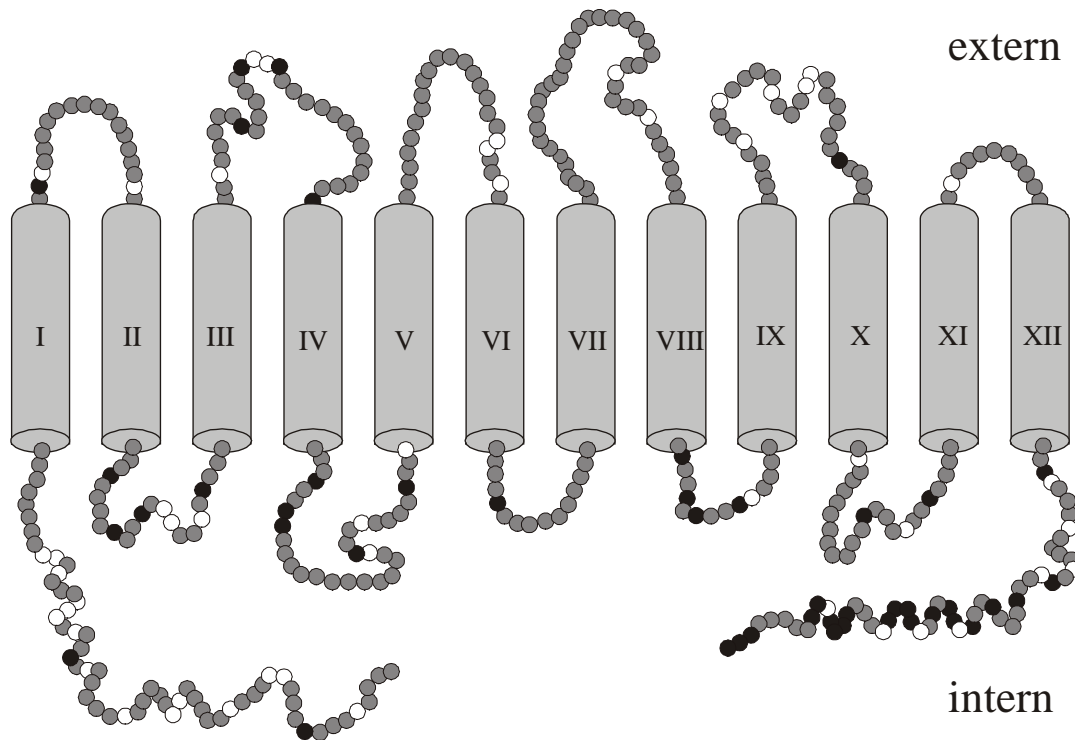


Abbildung 3: Sekundärstruktur-Topologiemodell von BetP. Die Topologievorhersage wurde mit dem Computerprogramm PHDThtm (Rost *et al.*, 1995) durchgeführt. Die N- und C-terminalen Extensionen des Proteins sind nach dieser Vorhersage zum Cytoplasma gerichtet. Die membrandurchspannenden Transmembrandomänen sind von I-XII durchnummeriert. Positiv geladene Aminosäuren sind schwarz, negativ geladene weiß dargestellt.

Erste Hinweise darauf, dass für die Wahrnehmung des Osmostresses durch BetP (Osmosensing) bzw. für dessen Aktivierung (Osmoregulation) keine Interaktion mit anderen Proteinen aus *C. glutamicum* notwendig ist, wurden durch eine heterologe Expression des *betP*-Gens in *E. coli* gewonnen, da die kinetischen Parameter (K_M -Werte, V_{max} für Glycinbetain), die in *E. coli* gemessen wurden, den Daten aus *C. glutamicum* sehr ähnlich waren. Unterschiede fanden sich jedoch bezüglich der Osmoregulation. Während das Osmolalitätsoptimum, also die externe Osmolalität, bei der das Aktivitätsmaximum erreicht wurde, in *C. glutamicum* bei 1350 mosm lag, lag diese in *E. coli* bei 600 mosm (Peter *et al.*, 1996). Um einen eventuellen Einfluss der Extensionen von BetP auf die Osmoregulation des Proteins zu untersuchen, wurden diese auf molekulargenetischer Ebene teilweise oder ganz deletiert und das Osmolalitätsoptimum der rekombinanten Proteine bestimmt. Eine Deletion der N-terminalen Domäne führte zwar zu einer Verschiebung des Osmolalitätsoptimums zu höheren Osmolalitätswerten, aber die Aktivitätsregulation war dennoch vorhanden. Eine Deletion der C-terminalen Domäne führte dagegen zu einer Deregulation von BetP, das heißt

das Protein nahm unabhängig von der extern angelegten Osmolalität Glycinbetain auf, so dass es auch unter nicht-hyperosmotischen Bedingungen aktiv war (Peter *et al.*, 1998a).

1.6 Mögliche Reize zur Wahrnehmung von hyperosmotischem Stress

Unter hyperosmotischen Stressbedingungen ist die Zelle einer Reihe von Einflüssen ausgesetzt, die sich sowohl auf die Cytoplasmamembran als auch auf das externe Medium und das Cytoplasma beziehen (Wood, 1999). Eine oder mehrere der stattfindenden Veränderungen werden von osmoregulierten Membranproteinen wahrgenommen – diesem „Osmosensing“-Prozess folgt entweder die direkte Aktivierung des Proteins oder die Weitergabe des Signals an ein Rezeptorprotein. Es ist sehr wenig darüber bekannt, welcher durch hyperosmotische Bedingungen hervorgerufene Reiz von osmoregulierten Membranproteinen detektiert wird. In den letzten Jahren und Jahrzehnten wurden viele dafür in Frage kommenden Reize diskutiert (Csonka & Hanson, 1991; Poolman & Glaasker, 1998; Wood, 1999), jedoch gibt es kaum experimentelle Daten, die belegen, welcher dieser Reize von den Proteinen wahrgenommen wird. Im folgenden werden die am meisten diskutierten Reize, die aus theoretischen Betrachtungen heraus für den „Osmosensing“-Prozess entscheidend sein könnten, aufgeführt.

Osmoregulierte Membranproteine könnten in der Lage sein, Veränderungen des Turgordrucks, d.h. den Unterschied zwischen dem extra- und intrazellulärem osmotischem Potenzial, der für den Anpressdruck der Cytoplasmamembran gegen die Zellwand verantwortlich ist, wahrzunehmen (Csonka & Hanson, 1991). Eine weitere vieldiskutierte Möglichkeit ist der direkte Einfluss von physikalischen Veränderungen der Membran auf ein osmoreguliertes Membranprotein unter hyperosmotischen Bedingungen. Erfährt eine Zelle hyperosmotischen Stress, erhöht sich aufgrund der Volumenverringering der Zelle die Membranspannung der Cytoplasmamembran, d.h. die Phospholipide und die Proteine innerhalb der Membran werden zusammengedrängt. Eine Erhöhung der Membranspannung könnte zu einem erhöhten lateralen Druck der Phospholipide auf die Membranproteine führen, was wiederum zu einer aktivierenden Konformationsänderung des Proteins führen könnte (Cantor, 1999). Außerdem wurde diskutiert, dass möglicherweise die Krümmung der Cytoplasmemembran, die durch einen hyperosmotischen Schock verändert wird, von den Proteinen wahrgenommen wird. (Wood, 1999). Des Weiteren könnte die Zusammensetzung der Phospholipidmembran die „Osmosensing“-Eigenschaften eines Proteins beeinflussen. Neben der Länge ihrer Fettsäureketten unterscheiden sich Phospholipide in ihren Kopfgruppen, die je nach Größe und Ladung unter

anderem den Hydratisierungszustand und die Ladungsdichte bzw. das Oberflächenpotenzial der Membranoberfläche beeinflussen (Shimooka *et al.*, 1992).

Ein weiterer, vor allem in den letzten Jahren vieldiskutierter möglicher Stimulus für Osmosensorproteine ist „makromolekulares Crowding“. Darunter wird die kollektive Einwirkung von Makromolekülen (gelöst oder als Strukturelement vorliegend) auf zelluläre Prozesse verstanden. Obwohl Makromoleküle (vor allem Proteine) nur schwach und unspezifisch mit Osmosensorproteinen wechselwirken können, könnte dieser Effekt physiologische Wirkung haben, weil Makromoleküle rund 50% des cytoplasmatischen Volumens einnehmen (Garner & Burg, 1994; Minton, 1997). Darüberhinaus könnten osmoregulierte Membranproteine in der Lage sein, die Osmolalität oder Ionenstärke, die im Cytoplasma oder im umgebenen Medium vorliegt, wahrzunehmen bzw. deren Differenz oder Gradient zwischen beiden Seiten der Membran. Letztendlich wäre es auch möglich, dass osmoregulierte Membranproteine die Konzentration eines bestimmten Solut, wie z.B. Ionen oder kompatible Solute, auf einer oder beiden Seiten der Membran wahrnehmen können.

1.7 Vorteile des Proteoliposomen-Systems

Bereits seit über 30 Jahren werden Proteoliposomen verwendet, um vor allem Membranproteine detailliert untersuchen zu können (z.B. Hinkle *et al.*, 1972; Krämer & Klingenberg, 1977; Schneider & Altendorf, 1987; Cornelius, 1991). Für die Herstellung von Proteoliposomen gibt es verschiedene Möglichkeiten – bei allen bekannten Rekonstitutionsverfahren wird gereinigtes Protein eingesetzt und mit Phospholipiden gemischt, wobei sich in einem noch nicht näher bekannten Prozess Proteoliposomen ausbilden (Rigaud *et al.*, 1995). In dieser Arbeit wurde isoliertes BetP mit einem auf Detergenzien beruhenden Verfahren rekonstituiert (Abbildung 4). Die BetP-Moleküle lagen nach deren Isolierung in Detergenzmicellen eingebettet vor und wurden mit unilaminaren Liposomen, in die sich ebenfalls Detergenzmoleküle eingelagert hatten, gemischt. Durch den schrittweisen Entzug der Detergenzien entstanden ohne weiteren Einfluss von außen Proteoliposomen.

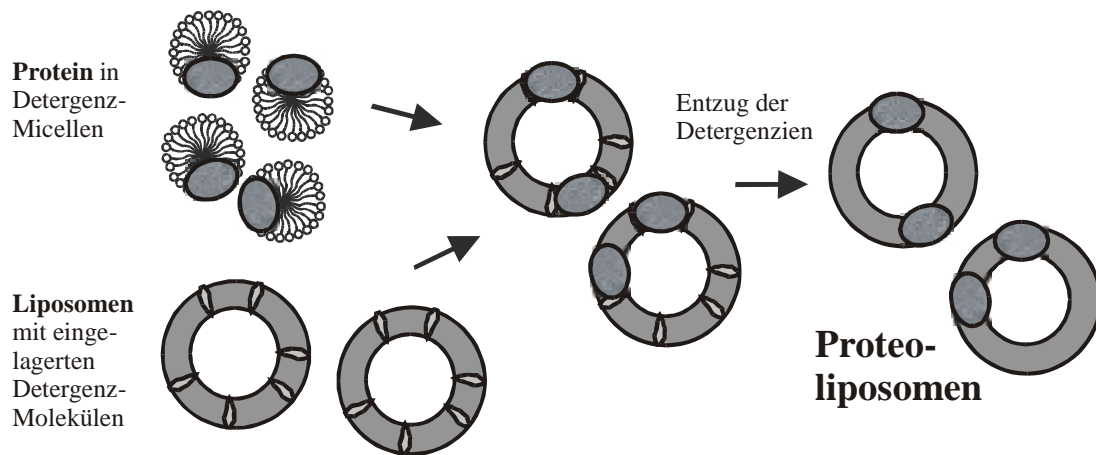


Abbildung 4: In dieser Arbeit verwendete Strategie des funktionellen Einbaus von BetP in Liposomen.

Es gibt zahlreiche Vorteile des Proteoliposomen-Systems gegenüber dem zellulären System. Die Umgebung eines in die Cytoplasmamembran eingebauten Membranproteins ist sehr komplex, so dass bei der Bewertung von Untersuchungen eines Membranproteins in intakten Zellen mögliche Interaktionen mit anderen Bestandteilen der Cytoplasmamembran und mit cytoplasmatischen und periplasmatischen Proteinen berücksichtigt werden müssen. Dies macht es unmöglich zu bewerten, ob für die Ausübung der Funktion das einzelne Protein ausreichend ist oder ob für dessen Funktion Wechselwirkungen mit anderen Bestandteilen der Zelle notwendig sind. Bei Untersuchungen an Proteinen, die in Liposomen rekonstituiert wurden, können die Ergebnisse direkt auf die Funktion des Proteins zurückgeführt werden. Die einzigen Parameter, die die Funktion des Membranproteins beeinflussen, sind die Phospholipidumgebung und das Innen- und Außenmedium. Ein weiterer wichtiger Vorteil von Funktionsstudien in Proteoliposomen ist, dass sowohl die Phospholipidumgebung als auch die Zusammensetzung des Lumens der Proteoliposomen und die Zusammensetzung des externen Mediums beinahe beliebig variiert werden können. Dies macht es möglich, die Funktion und die Eigenschaften eines Membranproteins sehr detailliert zu untersuchen. Darüberhinaus ist das Proteoliposomensystem ideal für osmoregulierte Membranproteine geeignet, da fast alle oben beschriebenen durch hyperosmotischen Stress hervorgerufenen Reize in diesem System untersucht werden können.

1.8 Ziel der Arbeit

Während die Osmostresswahrnehmung und -regulation unter hypoosmotischen Bedingungen relativ gut untersucht ist, war zu Beginn dieser Arbeit nur sehr wenig über die Osmostresswahrnehmung und -regulation unter hyperosmotischen Bedingungen bekannt. Daher war es Ziel dieser Arbeit, den Reiz, den eine Zelle unter hyperosmotischen Bedingungen wahrnimmt, zu identifizieren und zu beschreiben. Ein geeignetes Objekt, um dieses Ziel zu verfolgen, war der unter hyperosmotischen Bedingungen aktive Na⁺/Glycinbetain-Transporter BetP aus *Corynebacterium glutamicum*. Dazu war es erforderlich, das Protein heterolog in *E. coli* zu exprimieren und mit Hilfe einer Affinitätschromatographie zu isolieren, um es dann in Liposomen zu rekonstituieren und die Rekonstitutionsmethode zu optimieren. Anschließend sollte BetP im Proteoliposomen-System charakterisiert und dessen „Osmosensing“- und Osmoregulations-Eigenschaften untersucht werden. Im Mittelpunkt der Untersuchungen sollte dabei die Suche nach dem unmittelbaren Reiz stehen, der für die Aktivierung von BetP verantwortlich ist. Dabei sollte BetP als Modellprotein dienen, da für noch kein anderes osmoreguliertes Membranprotein der aktivierende Reiz identifiziert werden konnte.

2 Material und Methoden

2.1 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde in der Regel LB-Medium (1% NaCl, 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt; Sambrook *et al.*, 1989) verwendet. Für die Herstellung von LB-Agarplatten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5% Agar zugesetzt. Für Dauerkulturen wurde eine ÜN-Kultur mit 50% Glycerin versetzt und sowohl bei -20°C als auch bei -80°C gelagert.

Als Minimalmedium wurde ein Citrat-Phosphat-Puffer (pH 6,0), basierend auf Roe *et al.* (2000) verwendet: 9,16 g/l NaHPO_4 , 3,55 g/l Citrat, 1 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 g/l MgSO_4 , 25 mg/l FeSO_4 , 5 mg/l Thiamin, 0,2% Glukose. Diesem wurde sowohl eine 100-fach konzentrierte Vitaminlösung als auch eine 1000-fach konzentrierte Spurenelementelösung zugesetzt. Die Vitaminlösung setzte sich wie folgt zusammen: 1080 mg/l Pyridoxin-HCl, 300 mg/l Nicotinsäure, 72 mg/l Ca-Pantothenat, 56 mg/l Inosit, 22 mg/l Folsäure, 20 mg/l Nicotinamid, 16 mg/l p-Aminobenzoat, 8 mg/l Thiamin, 2,2 mg/l Biotin, 2 mg/l Riboflavin. Die Spurenelementelösung enthielt: 200 mg/l CoCl_2 , 100 mg/l NiCl_2 , 100 mg/l MnCl_2 , 70 mg/l ZnCl_2 , 50 mg/l $\text{Na}(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$, 20 mg/l CuCl_2 . Zur Kultivierung des *E. coli*-Stammes MKH13 wurde dem Medium außerdem 0,004% Arginin, Isoleucin und Valin zugesetzt.

Zur Selektion auf plasmidvermittelte Ampicillin-Resistenz wurde den Medien 50 $\mu\text{g/ml}$ Carbenicillin zugesetzt.

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

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

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme.

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 α mcr	<i>endA1 supE44 thi-1λ recA1 gyrA96 relA1 deoR</i> $\Delta(\text{lacZYA-argF})$ U169 $\Phi 80\text{dlacZ}\Delta\text{M15}$ <i>mcrA</i> $\Delta(\text{mrr hsdRMS mcrBC})$	Grant <i>et al.</i> , 1990
MKH13	<i>araD39 (argF-lac) U169 relA51 rps150 flbB5301 deoC ptsF25</i> $\Delta(\text{putPA})101$ $\Delta(\text{proP})2$ $\Delta(\text{proU})$	Kempf & Bremer, 1995

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Plasmid	Resistenz	Genotyp / Klonierung	Referenz
pASK-IBA5	Amp ^R	Expressionsvektor	Skerra, 1994
pASK-IBA5- <i>betP</i>	Amp ^R	pASK-IBA5 mit <i>betP</i> in der <i>BsaI/HindIII</i> -Schnittstelle (N-terminal: Strep-tagII)	Rübenhagen <i>et al.</i> , 2000
pAcl1	Amp ^R	pASK-IBA5- <i>betP</i> C252T (Cys-freies Protein)	diese Arbeit
pAcl1 S4C	Amp ^R	pAcl1 mit Codonaustausch	diese Arbeit
pAcl1 S61C	Amp ^R	pAcl1 mit Codonaustausch	diese Arbeit
pAcl1 D82C	Amp ^R	pAcl1 mit Codonaustausch	diese Arbeit
pAcl1 S89C	Amp ^R	pAcl1 mit Codonaustausch	diese Arbeit
pAcl1 L127C	Amp ^R	pAcl1 mit Codonaustausch	diese Arbeit
pAcl1 E161C	Amp ^R	pAcl1 mit Codonaustausch	diese Arbeit
pAcl1 R392C	Amp ^R	pAcl1 mit Codonaustausch	diese Arbeit
pAcl1 S516C	Amp ^R	pAcl1 mit Codonaustausch	diese Arbeit
pAcl1 S545C	Amp ^R	pAcl1 mit Codonaustausch	diese Arbeit
pAcl1 R595C	Amp ^R	pAcl1 mit Codonaustausch	diese Arbeit
pAcl1 C0-Del.	Amp ^R	PCR: 52 AS deletiert	diese Arbeit
pAcl1 C2-Del.	Amp ^R	PCR: 23 AS deletiert	diese Arbeit
pAcl1 C3-Del.	Amp ^R	PCR: 12 AS deletiert	diese Arbeit
pASK-IBA3	Amp ^R	Expressionsvektor	Skerra, 1994
pASK-IBA3- <i>betP</i>	Amp ^R	pASK-IBA3 mit <i>betP</i> in der <i>BsaI/HindIII</i> -Schnittstelle (C-terminal: Strep-tagII)	diese Arbeit

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmiden erfolgte aus 3 ml einer LB-Übernachtskultur nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979). Hierfür wurde das GFXTM Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Freiburg) nach Angaben des Herstellers angewendet. Dabei wurde nach Lyse der Zellen und Abtrennung der denaturierten, nicht-löslichen Zellbestandteile der Überstand mit Hilfe von Säulen aus Glasfibrermatrix aufgearbeitet. Die negativ geladene Plasmid-DNA wurde vom positiv geladenen Säulenmaterial gebunden und andere Zellbestandteile wurden in mehreren Waschschrinen entfernt. Die DNA wurde anschließend mit H₂O_{bidest} von der Säule eluiert.

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur *in vitro*-Vervielfältigung von DNA-Fragmenten verwendet (Mullis *et al.*, 1986). Dazu wurden zwei genspezifische Starter-Oligonukleotide („sense“ und „antisense“ Oligonukleotide; MWG Biotech AG, Ebersberg) verwendet, die den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankierten. Ein wiederholter Zyklus aus DNA-Denaturierung, Oligonukleotid-Anlagerung und Kettenverlängerung der Oligonukleotide mit *Taq* DNA-Polymerase[®] (DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus*; Roche Diagnostics, Mannheim) führte zur exponentiellen Vermehrung der DNA-Stränge. Für die Amplifizierung der DNA wurden die PCR-Geräte GeneAmp[®] PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) oder Thermocycler Progene (thermo-DUX, Wertheim / Main) verwendet. Ein typischer 20 µl PCR-Ansatz hatte folgende Zusammensetzung: 10 ng Plasmid-DNA, je 50 pmol „sense“ und „antisense“ Oligonukleotide (Tabelle 3), je 10 nmol dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2 µl 10-fach PCR-Puffer (Roche Diagnostics, Mannheim; 10 mM Tris/Cl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂) und 1 Unit *Taq* DNA-Polymerase[®]. Für die PCR wurde folgendes Temperaturprofil verwendet, wobei die Synthesegeschwindigkeit der *Taq*-Polymerase circa 1000 Basen/min betrug:

Denaturierung:	94°C	2 min	
30 Zyklen:	94°C	30 s	Denaturierung
	40-55°C	30 s	Oligonukleotid-Anlagerung
	72°C	1 min	Polymerisierungsreaktion.

2.3.3 Ortsgerichtete Mutagenese

Für die Anwendung der ortsgerichteten Mutagenese (Müller *et al.*, 1978), d.h. der Änderung eines Codons, die im Genprodukt zum Austausch einer Aminosäure führt, wurde in vielen Fällen eine Zweischnitt-PCR durchgeführt. Dazu wurden u.a. Oligonukleotide sowohl in „sense“- als auch „antisense“-Richtung verwendet, die sich in einem Codon von der Matrizen-DNA unterscheiden (Tabelle 3). Im ersten PCR-Schritt wurden zwei DNA-Stränge mit Hilfe jeweils eines verändernden und einem weiteren Oligonukleotid hergestellt, wobei die verändernden Oligonukleotide den gleichen DNA-Bereich abdeckten, einmal in „sense“- und einmal in „antisense“-Richtung. Im zweiten PCR-Schritt wurden jeweils 0,05 µl der gereinigten DNA-Fragmente der beiden PCR-Reaktionen als Matrizen-DNA sowie die beiden zuvor eingesetzten nicht verändernden Oligonukleotide verwendet.

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide. Ausgetauschte Nukleotide sind durch kleine Buchstaben dargestellt; veränderte Codons, die im Genprodukt einen AS-Austausch verursachen, sind fett dargestellt; Restriktionserkennungsstellen sind unterstrichen; die ausgeschaltete *Pst*I-Restriktionserkennungsstelle ist durchgestrichen.

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')
RBS/Start-s	CGA GGG CAA AAA ATG <u>GCT AGC</u> TGG
BetP-Strep/His 1	GC GCC <u>GAG ACC</u> ACT ACA TCT GAC CC
BetP-Strep/His 2	<u>AAG CTT</u> CTA TCG ACG CTT CCC
C-Strep s	AAA AAG <u>GGT CTC</u> AA ATG ACT ACA TCT GAC CCA AAT CC
C-Strep as	TCA CAG <u>GGT CTC</u> CGC GCT TCG ACG CTT CCC CGC GCC AC
BamHI-a	TCT GGT GTG GGC AAG GGG ATC CAG TAC CTC TCC
BamHI-b	GGA GAG GTA CTG GAT CCC CTT GCC CAC ACC AGA
EcoRV-b	GGA GCG GCC ACG GGA TAT CCG TGC CAA GAA CAT TCC
Bam-Loop10a	ACC TCT GCT GAC TCT GGA TCC ACC GTC ATG GGC
C252Ts	GGC ACG GCA act TCC CTT GGC CTT GGT GCC TTG CAG
C252Tas	TTG CAa GGC ACC AAG GCC AAG GGA Agt TGC CGT GCC
S4Cs	GGC GCC <u>GAG ACC</u> ACT ACA TgT GAC CCA AAT
S61Cs	CTT AAC TGG Tgc GTC ATC GTT
S61Cas	AAC GAT GAC gcA CCA GTT AAG
D82Cs	GGA TTC AAA tgT AGC TTT ACC
D82Cas	GGT AAA GCT Aca TTT GAA TCC
S89Cs	AAC TTT GCT tGT TCT GCG TTG
S89Cas	CAA CGC AGA ACa AGC AAA GTT
L127Cs	ACG ATT CGC Tgc GGC CGC ATT
L127Cas	AAT GCG GCC gcA GCG AAT CGT
E161Cs	GGA ACC ACA tgt CCT TTA ACC
E161Cas	GGT TAA AGG aca TGT GGT TCC
747s	ACC TTG CAT <u>CCA TGG</u> GCT ATC
R392Cs	TCC CGT GGC tGC TCC ATC CGT
R392Cas	ACG GAT GGA GCa GCC ACG GGA
S516Cs	AAT GCC TTG tGC AAC TTG CAA
S516Cas	TTG CAA GTT GCa CAA GGC ATT
S545Cas	CTC ACG GTA <u>CTC GAG</u> GTA GAT CAC ATC ATT GCa TAA GTC
R595Cas	TCA CAG GTC <u>AAG CTT</u> CTA aCa ACG CTT CCC
C0-delete-as	AAA AAA AAA <u>AAG CTT</u> CTA GTC CTT GAC TAA CGC AAA CAT
C2-DELas	AAA AAA AAA <u>AAG CTT</u> CTA GTG AAC ACG ACG TTC ACG GGC
C3-DELas	AAA AAA AAA <u>AAG CTT</u> CTA GCG TCG CTT TGC AGC CAG TTC
2040as	CAG TAG CGG TAA ACG GCA GAC

2.3.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten zur Restriktion oder Ligation wurden diese zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dies erfolgte in Gelen aus 0,8% Agarose (w/v) oder 4% Nu-Siève[®]-Agarose (w/v; FMC BioProducts, Rockland, USA), die jeweils in TAE-Puffer (40 mM Tris, 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA; pH 8,2) gelöst wurden. Mit Hilfe des QIAquick[™] Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) wurden die DNA-Fragmente aus den Agarosegelen isoliert, wobei die Durchführung nach dem Protokoll des Herstellers erfolgte.

2.3.5 Restriktion, Modifikation und Ligation von DNA

Die Standard-DNA-Techniken wurden nach der Methode von Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Die Restriktionen von PCR-Fragmenten oder Vektor-DNA wurden nach Angaben des Herstellers der Restriktionsenzyme durchgeführt (Roche, Mannheim). Dephosphorylierungen zur Verhinderung der Religation linearisierter Vektor-DNA wurden mit alkalischer Phosphatase aus Garnelen (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Ligationen wurden mit dem Ready-To-Go[™] T4-DNA-Ligase-Lyophilisat (Amersham Pharmacia, Freiburg) durchgeführt.

2.3.6 Transformation von kompetenten *E. coli*-Stämmen

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden kompetente Zellen der *E. coli*-Stämme DH5 α mcr und MKH13 benötigt, wobei der Stamm MKH13 für Messungen der Glycinbetain- und Serinaufnahme eingesetzt wurde. DH5 α mcr wurde mit einem Ligationsansatz transformiert (2.3.5), MKH13 mit bereits vervielfältigten Plasmiden (2.3.1).

2.3.6.1 Transformation von kompetenten *E. coli* DH5 α mcr-Stämmen

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurde die Methode von Inoue *et al.* (1990) eingesetzt. Dafür wurden 250 ml SOB-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,4% NaCl, 10 mM MgCl₂, 2,5 mM KCl) mit 1 ml einer über Tag gewachsenen Kultur angeimpft und 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 eiskaltem TB-Puffer (10 mM Pipes (pH 6,7), 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂) 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. Zur Transformation wurden 200 µl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, 4-12 µl des Ligationsansatzes (2.3.5) hinzugegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen erhielten 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 für 1 h bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden zentrifugiert, in 100 µl des Überstandes resuspendiert, auf LB-Agarplatten (50 µg/ml Carbenicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3.6.2 Transformation von kompetenten *E. coli* MKH13-Stämmen

Für die Herstellung der kompetenten Zellen wurde die Methode von Chung *et al.* (1989) eingesetzt. 10 ml LB-Medium wurden mit einer ÜN-Kultur 1:100 angeimpft und bei 37°C und 125 Upm bis zu einer OD₅₅₀ von circa 0,4 geschüttelt. Pro Transformationsansatz wurde 1 ml abgenommen, der für 10 min bei 2000 g (4°C) zentrifugiert wurde. Das Sedimente wurde in 100 µl TSS (LB-Medium, 10% PEG, 5% DMSO, 50 mM MgCl₂) resuspendiert, bevor 1 µl Plasmid (2.3.1) hinzugegeben und der Ansatz für 30 min bei 4°C inkubiert wurde. 900 µl SOC-Medium wurden hinzugegeben und für 1 h bei 37°C geschüttelt. 100 µl des Ansatzes wurden auf LB-Agarplatten (50 µg/ml Carbenicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3.7 Sequenzierung von DNA und Sequenzanalyse

Die Sequenzierreaktion wurde nach der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) mit Modifikationen nach Zimmermann *et al.* (1990) durchgeführt. Bei der hier beschriebenen Methode wurden die Sequenzierprodukte über die ddNTPs mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Reaktion wurde mit Hilfe des ABI PRISM™ Big Dye Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt) nach dem Protokoll des Herstellers ausgeführt. Die Sequenzierungsprodukte wurden kapillarelektrophoretisch mit Hilfe der automatischen Sequenzierapparatur ABI PRISM 310 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) getrennt und detektiert.

2.4 Allgemeine analytische Methoden

2.4.1 Protein-Konzentrationsbestimmungen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde in der Regel nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Für die Bestimmung des Proteingehalts der Proteoliposomen wurde die Amido-Schwarz-Methode (Schaffner & Weissmann, 1973) angewendet, da bei dieser Methode die im Ansatz enthaltenen Lipide die Konzentrationsbestimmung nicht beeinflussen. Zum Erstellen von Eichreihen wurde BSA verwendet.

2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden 12,5%-ige SDS-Polyacrylamidgele (Laemmli, 1970) verwendet. 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 Westernblot-Analyse

Zum immunologischen Nachweis der Proteine mit Antikörpern wurde die Methode von Towbin *et al.* (1979) verwendet. Die Übertragung der Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran wurde mit dem *semi-dry*-Blotverfahren (Kyhse-Andersen, 1984) durchgeführt. Die Blockierung von freien Bindungsstellen auf der Membran erfolgte mit 3% BSA in Waschpuffer (100 mM Tris/Cl (pH 7,5), 9% NaCl). Der anschließende immunologische Nachweis von BetP erfolgte entweder mit Streptavidin-AP-Konjugat (1:5000; BioRad, München) oder Avidin-AP-Konjugat (1:2500; BioRad, München). Der kolorimetrische Nachweis erfolgte durch die Reaktion der alkalischen Phosphatase mit BCIP/NBT (Sigma FastTM-Tabletten, Sigma, Steinheim) in Färbelösung (100 mM Tris/Cl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Stopreagenz (0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,025% KH₂PO₄, 0,2% Na₂HPO₄, 0,75% Tritriplex III EDTA; pH 7,2) gestoppt.

2.4.4 Bestimmung der Osmolalität

Zur Bestimmung der Osmolalität eines Puffers oder Mediums wurde ein Osmometer (Osmomat 030; Gonotec, Berlin) nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Standard wurden 150 mM NaCl (300 mosm) verwendet.

2.4.5 Bestimmung der internen K^+ -Konzentration

Um die K^+ -Konzentration im Zellinneren von *E. coli*-Zellen zu bestimmen, wurde 1 ml der Zellen unter Verwendung einer Mehrfachfiltrationsanlage (Hölzel, Dörfen) auf einen Zellulose-Mischester-Filter (0,45 μ m Porengröße; Millipore, Eschborn) gefiltert. Um die Zellen aufzuschließen, wurde der Filter mit 0,1% CTAB für 15 min bei RT inkubiert und mehrmals gevortext. Anschließend wurde die K^+ -Konzentration des Überstands mittels Atomemissionsspektroskopie in einem Flammenphotometer (Elex 6361, Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Um zu bestimmen, welcher Anteil der extern vorliegenden K^+ -Ionen in die Zellen aufgenommen wurde, wurde außerdem die Gesamt- K^+ -Konzentration in der Zellsuspension bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit 0,1% CTAB aufgeschlossen und so verdünnt, dass die K^+ -Konzentration unter 100 μ M lag. Auch hier erfolgte die Bestimmung der K^+ -Konzentration mittels Atomemissionsspektroskopie. Die interne K^+ -Konzentration wurde auf der Grundlage berechnet, dass eine OD_{578} von 3 einem Zelltrockengewicht von 1 mg/ml entspricht (Bakker & Mangerich, 1981) und das cytoplasmatische Volumen bei 1,6 μ l/mg Trockengewicht liegt (Roe *et al.*, 2000).

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Membranpräparation

Für die Präparation von Plasmamembranen aus *betP*-exprimierenden *E. coli*-Zellen wurde LB-Medium (50 µg/ml Carbenicillin) mit einer ÜN-Kultur 1:30 angeimpft und bei 37°C und 125 Upm geschüttelt. Bei einer OD₅₅₀ von circa 1,5 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, wobei als Proteasehemmer 1 mM Pefabloc[®] (Boehringer, Mannheim) eingesetzt wurde. Die Zellen wurden mit einer „French Press“ (2-3 Durchgänge; SLM Aminco[®], Rochester, USA) bei einem Druck von 20.000 psi aufgeschlossen. Nachdem die Zelltrümmer abzentrifugiert wurden, wurden die Membranen bei 200.000 g für 1 h sedimentiert. Die Membranen wurden mit dem oben aufgeführten Puffer gewaschen, in 1 ml Puffer pro Liter Zellkultur resuspendiert und bei -80°C gelagert.

2.5.2 Isolierung von Strep-BetP mit der StrepTactin[®]-Affinitätschromatographie

Als Voraussetzung zur die 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. Bei der Reinigung von Strep-BetP wurde ausgenutzt, dass *Strep-tag*[®]II mit hoher Spezifität an StrepTactin[®] (Voss & Skerra, 1997) bindet und mit Desthiobiotin wieder eluiert werden kann.

Alle im folgenden beschriebenen Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Zur Solubilisierung von *E. coli*- Plasmamembranen (2.5.1) wurde in der Regel 1 ml der Membranen mit folgenden Reagenzien 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 (Roche, Mannheim) tropfenweise unter Rühren bis zu einer Konzentration von 2% hinzugegeben und der Ansatz für 30 min inkubiert, bevor das Solubilisat bei 90.000 g für 20 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde mit Puffer K (50 mM KP_i-Puffer (pH 8,0), 200 mM NaCl, 8,6% Glycerin, 1 mM EDTA) vierfach verdünnt, um zum Schutz des Säulenmaterials die Detergenzkonzentration zu verringern.

Das Säulenmaterial (mit StrepTactin[®] beladene Sepharose; IBA, Göttingen) wurde mit Puffer K' (Puffer K, 0,1% Dodecylmaltosid) äquilibriert. Das verdünnte Solubilisat wurde auf die

äquilibrierte Säule aufgetragen, wobei die Durchflussrate auf circa 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ eingestellt wurde. Anschließend wurde die Säule mit Puffer K' gewaschen (2-3-faches Säulenvolumen). Das an der Säule gebundene Protein wurde mit Puffer K'' (Puffer K', 5 mM Desthiobiotin) eluiert, wobei sich der Hauptteil des gereinigten Proteins im zweiten Elutions-Säulenvolumen befand. Die Elutionsfraktionen mit den höchsten Proteinkonzentrationen wurden sofort für die Rekonstitution verwendet oder bei -20°C gelagert. Zur Regeneration der Säule wurde das Desthiobiotin mit circa fünf Säulenvolumen 1 mM HABA (in Puffer K) verdrängt und anschließend das StrepTactin[®]-Material mit circa zwei Säulenvolumen Puffer K gewaschen.

2.5.3 Präparation von Liposomen

Zur Herstellung von Liposomen wurde lyophilisiertes Pulver von *E. coli polar total lipid extract* (Avanti Polar Lipids, Inc., USA), L- α -Phosphatidylcholin, L- α -Phosphatidylglycerin (jeweils aus Eigelb; Sigma, Steinheim) oder Mischungen dieser Lipide in 100 mM KPi (pH 7,5), 2 mM β -Mercaptoethanol unter Zugabe von 1,5% (w/v) n-Octyl- β -D-Glucopyranosid (Calbiochem, Bad Soden) gelöst und bei RT gerührt. Dabei wurde eine Lipidkonzentration von 20 mg/ml eingestellt. Die Lipidsuspension wurde in Dialyseschläuche (Durchmesser: 6 mm; Porengröße: 2,5 nm; Serva, Heidelberg) gefüllt und gegen mindestens dem 20-fachen Volumen 100 mM KPi (pH 7,5), 2 mM β -Mercaptoethanol unter leichtem Rühren bei RT dialysiert. Der Puffer wurde dreimal nach jeweils 4-5 h gewechselt. Die dialysierten Lipide wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.5.4 Trübungsmessung

1 ml *E. coli*-Liposomen (circa 0,5 – 2 mg/ml Lipid) wurde durch circa 10-maliges Extrudieren durch eine Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 400 nm (LFLM-400; Milsch, Laudenbach) zu unilaminaren Liposomen einheitlicher Größe geformt. Bei dem hierzu verwendeten Extruder handelte es sich um einen LiposoFast[™]-Basic von der Firma Avestin Inc. (Ottawa, Kanada). Zur Verhinderung der erneuten Ausbildung von multilaminaren Strukturen wurden alle folgenden Schritte bei RT durchgeführt. Die optische Dichte der Liposomensuspension wurde im Photometer bei 600 nm bestimmt. Durch sukzessiven Zusatz einer 20%-igen (v/v) Triton X-100-Lösung konnte die zunehmende Solubilisierung der Liposomen bis hin zur vollständigen *mixed micelles*-Bildung über die Abnahme der optischen Dichte verfolgt werden.

2.5.5 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 und circa zehnmal extrudiert (Porengröße: 400 nm). Die extrudierten Liposomen wurden für 10 min unter leichtem Schütteln bei RT mit 0,5% Triton X-100 (v/v; entspricht 1 μl /mg Lipid) behandelt; dies führte zu einer 15%-igen Solubilisierung der Liposomen (Abbildung 6). Gereinigtes Strep-BetP wurde mit den solubilisierten Liposomen gemischt, wobei, wenn nicht anders angegeben, ein Lipid-Protein-Verhältnis (LPR) von 30:1 (w/w) eingestellt wurde. Zur Abreicherung des Detergenz wurde direkt anschließend der Ansatz mit x mg Biobeads (Naßgewicht; BioRad, München; $x = \text{eingesetzte } \mu\text{l Triton X-100} * 5 + \text{eingesetzte } \mu\text{g Dodecylmaltosid} * 10$) zweimal für je 1 h bei RT und einmal mit der doppelten Menge Biobeads über Nacht bei 4°C inkubiert, wodurch der Einbau des Proteins in die Liposomen gewährleistet wurde. Nach Abtrennung der Biobeads wurden die Proteoliposomen zentrifugiert (400.000 g, 20 min, 15°C), zweimal mit 100 mM KP_i (pH 7,5) gewaschen, im gleichen Puffers resuspendiert (circa 400 μl /mg eingesetztes Protein), aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.5.6 Synthese von ^{14}C -Glycinbetain

Die Glycinbetain-Synthese erfolgte nach der Methode von Landfald & 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 ^{14}C -CholinCl-Lösung (1,85 MBq; spez. Aktivität: 2,0 GBq/mmol; Amersham, Braunschweig) und 250 μl 100 mM NaP_i (pH 8,0), in dem 30 Units Cholinoxidase aus *Alcaligenes sp.* (Sigma, Steinheim) gelöst waren. Die Reinigung des synthetisierten ^{14}C -Glycinbetains erfolgte mittels Kationenaustauscher-Säulen (Dowex 50W), die durch Waschen mit 1 M HCl in die protonierte Form gebracht wurden. Der Reaktionsansatz wurde auf die Säulen gegeben und das ^{14}C -Glycinbetain mit 2 M NH_4OH eluiert. Das Eluat wurde in einem Geschwindigkeits-Vakuum-Konzentrierer (Eppendorf, Hamburg) getrocknet und in 2 ml H_2O aufgenommen.

2.5.7 Radiochemische Transportmessungen

2.5.7.1 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 (400.000 g, 20 min, 15°C). Aufgrund dieser Prozedur war es möglich, den internen Puffer frei zu wählen, da der verwendete Puffer während des Extrudierens in die Proteoliposomen gelangt. Die Proteoliposomen wurden in einem geringem Volumen resuspendiert und nie niedrigeren Temperaturen als 15°C ausgesetzt.

Zur Messung der Transportaktivität von BetP wurde ein externer Puffer verwendet, der in der Regel entweder 20 mM NaP_i (pH 7,5), 25 mM NaCl oder 100 mM Tris/Mes (pH 7,5), 15 mM NaCl enthielt. In der Regel wurde die jeweils gewünschte Osmolalität dieses Puffers mit NaCl, Sorbitol oder Prolin eingestellt. Während einer typischen Transportmessung wurden 500 μl externem Puffer 15 μM ^{14}C -Glycinbetain und 0,1 μM Valinomycin zugesetzt. Zum Starten der Reaktion wurden dem Ansatz, der bei RT gerührt wurde, 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; Millipore, Eschborn) gegeben und mit Hilfe einer Mehrfachfiltrationsanlage (Hoefer, Pharmacia Biotech) gefiltert. Der Filter, auf dem die Proteoliposomen adsorbiert wurden, wurde mit 2,5 ml 100 mM LiCl gewaschen, mindestens 1 h mit 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint ecoplus, Roth, Karlsruhe) inkubiert, bevor in einem β -Strahlen-Zählgerät (Beckman, München) die Menge der aufgenommenen Radioaktivität bestimmt wurde. Zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität des Reaktionsansatzes wurden 100 μl direkt mit Szintillationsflüssigkeit inkubiert und dessen Radioaktivität bestimmt. Alle im Ergebnisteil angegebenen Transportraten sind, wenn nicht anders angegeben, Durchschnittswerte aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

2.5.7.2 Messungen der Glycinbetain-Aufnahme in *E. coli*-Zellen

Zur Messung der BetP-Aktivität in *E. coli*-Zellen wurde LB-Medium (50 $\mu\text{g/ml}$ Carbenicillin) mit einer ÜN-Kultur in einem Verhältnis von 1:50 angeimpft, bei 37°C und 120 Upm bis zu einer OD_{550} von circa 0,5 geschüttelt, mit 200 μg AHT / Liter Zellkultur induziert und weitere 2 h geschüttelt. In der Regel wurden die Zellen mit 100 mM Tris/Mes (pH 7,5) gewaschen,

bevor mit dem gleichen Puffer eine OD₅₅₀ von circa 1 eingestellt wurde. Für die Transportmessung wurde 1 ml der Zellen circa 1 min bei 30°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 10 mM Glukose zum Energetisieren der Zellen, bevor die Zellen durch Zugabe von 200 mM NaCl hyperosmolar gestresst wurden. Nach circa einer Minute wurde die Substrataufnahme durch Zugabe von 250 µM ¹⁴C-Glycinbetain gestartet. Wenn Sorbitol im externen Puffer verwendet wurde, wurde nach folgender Prozedur verfahren: Die Zellen wurden in einem mit LB-Medium isoosmotischen Puffer (100 mM Tris/Mes (pH 7,5), 330 mM Sorbitol, 10 mM NaCl; 450 mosm) gewaschen, bevor mit dem gleichen Puffer eine OD₅₅₀ von circa 30 eingestellt wurde. Für die Transportmessung wurden 950 µl externer Puffer auf 30°C erwärmt und 10 mM Glukose sowie 250 µM ¹⁴C-Glycinbetain hinzugegeben.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Zellen gestartet und nach 15, 30, 45 und 90 sec wurden jeweils 200 µl der Zellsuspension auf Glasfaserfilter (Typ F, Millipore, Eschborn) über eine Mehrfachfiltrationsanlage abfiltriert. Unmittelbar nach der Filtration wurden die Filter mit 2 x 2,5 ml Waschlösung (500 mM Saccharose, 50 mM MgCl₂, nach Perroud & Le Rudelier, 1985) gewaschen und die Proben mit 3,5 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Die auf dem Filter verbleibende Radioaktivität wurde in einem β-Strahlen-Zählgerät bestimmt. Die Berechnung der Substrataufnahmerate erfolgte auf der Grundlage, dass eine OD₅₅₀ von 1 einem Zelltrockengewicht von 0,34 mg/ml entspricht.

2.5.7.3 Messungen der Substrat-Aufnahme in *E. coli*-Zellen unter K⁺-limitierenden Bedingungen

Zur Messung der Glycinbetain- bzw. Serinaufnahme von *E. coli*-Zellen unter K⁺-limitierenden Bedingungen wurde Minimalmedium (50 µg/ml Carbenicillin) mit 100 µM KCl und 125 mM NaCl versetzt und mit einer ÜN-Kultur 1:20 angeimpft, bei 37°C und 120 Upm bis zu einer OD₅₅₀ von circa 0,3 geschüttelt, mit 200 µg AHT / Liter Zellkultur induziert und weitere 2 h geschüttelt. Die Zellsuspension wurde in zwei Ansätze aufgeteilt, deren Zellen jeweils abzentrifugiert wurden. Der erste Ansatz wurde mit 100 mM Tris/Mes (pH 7,5), 200 mM NaCl gewaschen, in dem gleichen Puffer resuspendiert und bis zur Transportmessung auf Eis gelagert. Der zweite Ansatz wurde mit K⁺-freiem und mit 125 mM NaCl versetztem Minimalmedium (500 mosm) gewaschen und in dem gleichen Puffer resuspendiert, wobei eine OD₅₅₀ zwischen 1 und 2 eingestellt wurde. Um eine schnelle Sedimentierung der Zellen in einer Tischzentrifuge zu gewährleisten, wurde die Zellsuspension in 2ml-Reaktionsgefäße überführt. Um einen Ausstrom der internen K⁺-Ionen aus der Zelle

durch eine Verringerung der externen Osmolalität zu erreichen, wurden die Zellsedimente mit verdünntem Minimalmedium (100 mosm) resuspendiert und so schnell wie möglich zentrifugiert, um eine Wiederaufnahme der K^+ -Ionen in die Zellen zu minimieren. Anschließend wurden die Zellsedimente mit noch stärker verdünntem Minimalmedium (20 mosm) resuspendiert und wieder so schnell wie möglich zentrifugiert. Die Zellen wurden mit 100 mM Tris/Mes (pH 7,5), 200 mM NaCl resuspendiert und bis zur Transportmessung auf Eis gelagert. Die Substrataufnahmemessung erfolgte jeweils mit $250 \mu\text{M}$ ^{14}C -Glycinbetain (2.5.7.2) bzw. $75 \mu\text{M}$ ^{14}C -Serin (Amersham Buchler International, Buckinghamshire, GB) bei 30°C , wobei die Zellen zuvor mit $10 \mu\text{M}$ Glukose energetisiert wurden. Der weitere Ablauf der Substrataufnahmemessung erfolgte wie unter 2.5.7.2 beschrieben.

2.5.8 Bestimmung der Topologie von BetP

2.5.8.1 Bestimmung der Lokalisation der Extensionen von BetP durch ELISA

Um zu bestimmen, ob der N- bzw. C-terminale Bereich von BetP zum Cytoplasma oder zur Zell-externen Seite gerichtet ist, wurde ein modifizierter ELISA (Burkovski, 1996) durchgeführt. Dabei wurden Sphäroplasten oder invertierte Membranvesikel an Mikrotiterplatten gebunden und die immunologische Reaktion des N- bzw. C-terminalen Strep-tagII mit Streptavidin-AP-Konjugat nachgewiesen.

40 ml LB-Medium ($50 \mu\text{g/ml}$ Carbenicillin) wurden mit einer ÜN-Kultur 1:40 angeimpft, bei 37°C und 125 Upm bis zu einer OD_{550} von circa 0,5 inkubiert, die Synthese von BetP wurde durch Zugabe von $200 \mu\text{g}$ AHT / Liter Zellkultur induziert und weitere 40-120 min geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4°C), mit 650 mM Saccharose, 33 mM Tris/Cl (pH 8,0) gewaschen und im gleichen Puffer resuspendiert (80 ml/g Zellnassgewicht). Zu den Zellen wurden $1/5$ Volumen 100 mM EDTA zugegeben, bevor sie in zwei gleich große Ansätze aufgeteilt wurden. Zur Herstellung von Sphäroplasten wurde der erste Ansatz für 45 min bei RT mit $0,05 \text{ mg/ml}$ Lysozym behandelt. Die Bildung der Sphäroplasten wurde lichtmikroskopisch überprüft. Zur Herstellung von invertierten Membranvesikeln wurden die Zellen des zweiten Ansatzes in einem Eisbad mit Ultraschall behandelt ($4 \times 20 \text{ sec}$, Stärke 5; Branson Sonifier W-250, Branson Sonic Power Co, Danbury, USA). Von beiden Ansätzen wurden Verdünnungen hergestellt, von denen je $200 \mu\text{l}$ in die Reaktionsräume einer MaxiSorp-Immunoplatte (Nunc, Roskilde, Dänemark) aufgetragen und für 1 h bei RT inkubiert wurden. Die freien Bindungsstellen der Reaktionsräume wurden mit $250 \mu\text{l}$ 3% BSA in

Waschpuffer (10 mM Tris/Cl (pH 7,5), 0,9% NaCl) für 1 h bei RT blockiert und fünfmal mit 300 μ l Waschpuffer gewaschen. Der anschließende immunologische Nachweis von BetP erfolgte mit 200 μ l Streptavidin-AP-Konjugat (1:5000 in Waschpuffer) über Nacht bei 4°C, bevor die Reaktionsräume fünfmal mit je 300 μ l Waschpuffer gewaschen wurden. Die Inkubation mit einem Substrat der AP erfolgte mit 200 μ l NPP-Lösung (1 mg/ml p-Nitrophenyl-Phosphat in 100 mM Glycin-NaOH (pH 10,4), 1 mM ZnCl₂, 1 mM MgCl₂; Sigma, Steinheim) für 20-60 min. Anschließend wurde die Absorption bei 405 nm und damit die Intensität der Immunreaktion gemessen (1420 VICTOR multilabel counter; PerkinElmer Life Sciences, Inc., USA). Die Berechnung der Anzahl der Sphäroplasten bzw. invertierten Membranvesikel pro Reaktionsraum erfolgte auf der Grundlage, dass eine OD₅₅₀ von 1 circa 10⁹ Zellen entspricht.

2.5.8.2 Messung der Zugänglichkeit der „Einzelcystein-BetP-Proteine“ für thiol-spezifische Reagenzien in Zellen und invertierten Membranvesikeln

Die Zugänglichkeitsmessungen wurden nach der Methode von Jung *et al.* (1998b) durchgeführt. Dabei wurde untersucht, ob die Lage einer Aminosäure von BetP, die gegen Cystein ausgetauscht wurde, auf der internen oder externen Seite der Membran liegt. Dazu wurden die thiol-spezifischen Reagenzien SM (4-Acetamino-4'-maleimidylstilben-2,2'-disulfonat) und BM (3-(N-Maleimidylpropionyl)-Biocytin) verwendet. Während SM membran-impermeabel ist, ist BM membran-permeabel und lässt sich immunologisch mit Avidin-AP-Konjugat nachweisen.

900 ml LB-Medium (50 μ g/ml Carbenicillin) wurden 1:30 mit einer ÜN-Kultur angeimpft und bei 37°C und 125 Upm geschüttelt. Bei OD₅₅₀ von circa 1,5 wurde die Kultur mit 200 μ g AHT / Liter Zellkultur induziert und mindestens drei weitere Stunden geschüttelt. Die abzentrifugierten Zellen (4°C) wurden mit 100 mM KP_i (pH 7,5), 1 mM Pefabloc[®] (Proteasehemmer; Boehringer, Mannheim) gewaschen, in 3 ml des gleichen Puffers resuspendiert und in drei gleich große Ansätze aufgeteilt. Ein Ansatz wurde 30 min bei RT mit 400 μ M SM (Molecular Probes, Eugene, USA) inkubiert und zweimal mit dem gleichen Puffer gewaschen. Alle drei Ansätze wurden zentrifugiert und die Zellsedimente bei -20°C eingefroren. Die Zellen wurden mit je 3 ml 100 mM KP_i (pH 7,5), 2 mM Pefabloc[®] resuspendiert und 4 x 20 sec (Stärke 5) mit Ultraschall behandelt. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und der Überstand bei 400.000 g zentrifugiert (20 min, 4°C). Die Membransedimente wurden mit 100 mM KP_i (pH 7,5) gewaschen und in je 300 μ l resuspendiert. Um

auch die invertierten Membranvesikel mit SM zu behandeln, wurde ein weiterer der drei Ansätze 30 min bei RT mit 400 μ M SM inkubiert und mit 100 mM KP_i (pH 7,5) gewaschen. Mit allen drei Ansätzen wurde das in die Zellmembran eingebaute Strep-BetP gereinigt (2.5.2) und aliquotiert bei -20°C gelagert. Die Proteine wurden für 30 min bei RT mit 200 μ M BM (Molecular Probes, Eugene, USA) inkubiert, bevor eine SDS-PAGE und ein Westernblot mit dem Avidin-AP-Konjugat (1:2500) durchgeführt wurde, mit dessen Hilfe eine Reaktion eines Einzel-Cystein-BetP-Proteins mit BM nachgewiesen werden konnte.

2.5.8.3 Messung der Zugänglichkeit der „Einzelcystein-BetP-Proteine“ für thiol-spezifische Reagenzien in Proteoliposomen

10-50 μ l Proteoliposomen (2.5.5) aus *E. coli*-Lipiden und „Einzelcystein-BetP-Proteinen“ wurden mit 100 mM KP_i (pH 7,5) auf 500 μ l aufgefüllt, extrudiert, zentrifugiert (400.000 g, 20 min, 15°C), in 100 μ l des gleichen Puffers resuspendiert und in zwei gleich große Ansätze aufgeteilt. Der erste Ansatz wurde mit 100-400 μ M SM für 5-30 min inkubiert, 50-fach mit 100 mM KP_i (pH 7,5) verdünnt, zentrifugiert und in 500 μ l des gleichen Puffers resuspendiert, während der zweite Ansatz auch auf 500 μ l aufgefüllt wurde. Beide Ansätze wurden mit 200 μ M BM (in DMSO gelöst) für 30 min inkubiert, wobei die Endkonzentration von DMSO bei 1% lag. Die Ansätze wurden 5-fach mit 100 mM KP_i (pH 7,5) verdünnt, zentrifugiert und in je 10 μ l des gleichen Puffers resuspendiert. Nach Zugabe von 3,5 μ l 4-fach konzentrierten Probenpuffers (2.4.2) erfolgte eine SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot, wobei das Avidin-AP-Konjugat verwendet wurde.

2.5.8.4 Immunologische Zugänglichkeit von Strep-tagII in Proteoliposomen mit ELISA

Unilaminare Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipid und Strep-BetP wurden auf eine Proteinkonzentration von 25, 100 bzw. 300 ng/ml verdünnt. Jeweils die Hälfte von jeder Verdünnung wurde mit 1 μ l bzw. 3 μ l Triton X-100 / mg Lipid inkubiert, um die Proteoliposomen zum Teil bzw. vollständig zu solubilisieren. Je 200 μ l der Verdünnungen wurden in die Reaktionsräume einer MaxiSorp-Immunoplatte aufgetragen und für 1 h bei RT inkubiert. Der weitere methodische Ablauf erfolgte wie unter 2.5.8.1 beschrieben.

3 Ergebnisse

3.1 Optimierung der Expression, Reinigung und Rekonstitution von Strep-BetP

Eine funktionelle Untersuchung von membranständigen Transportproteinen in Proteoliposomen ist umso erfolgreicher und genauer, je höher die gemessenen Substrataufnahmeraten unter optimalen Bedingungen sind. Deshalb war es für Funktionsuntersuchungen von BetP im rekonstituierten System notwendig, möglichst viel funktionsfähiges BetP-Protein zu synthetisieren und reinigen. Das isolierte Protein sollte nach Möglichkeit nicht mit anderen Proteinen verunreinigt sein, um deren mögliche Einflüsse auf die Funktionsuntersuchung von BetP auszuschließen. Während der Rekonstitution des isolierten Proteins gab es schließlich zahlreiche Variationsmöglichkeiten zur Optimierung der Methode, wobei zu bedenken ist, dass für jedes neu zu rekonstituierende Membranprotein die optimalen Rekonstitutionsbedingungen neu bestimmt werden müssen (Rigaud *et al.*, 1995).

3.1.1 Heterologe Expression von Strep-BetP in *E. coli* DH5 α mcr

Zur Reinigung von BetP wurde der Expressionsvektor pASK-IBA5-*betP* konstruiert (Rönsch, persönliche Mitteilung). In diesem Vektor ist *betP* an seinem 5'-Ende mit der codierenden Sequenz des Strep-tagII ligiert, so dass ein BetP-Protein synthetisiert wird, das N-terminal über einen Linker aus vier Aminosäuren mit Strep-tagII fusioniert ist. Strep-tagII ist ein Peptid aus acht Aminosäuren, das die spezifische Bindung von Strep-BetP an StrepTactin ermöglicht. Das *strepbetP*-Gen in pASK-IBA5-*betP* steht unter Kontrolle der Promotor/Operator-Region des *tetA*-Resistenzgens, die durch Anhydrotetracyclin induziert werden kann.

Durch die erfolgreiche heterologe Expression von *strepbetP* in *E. coli* DH5 α mcr knickte die Wachstumskurve nach Zugabe des Induktors im Vergleich zum Stamm, der den Vektor pASK-IBA5 enthielt, deutlich ab (Daten nicht gezeigt). Da die Temperatur, bei der Zellen angezogen werden, häufig Einfluss auf die Einbaurrate von Proteinen in die Membran hat, wurden die Zellen sowohl bei 30°C als auch bei 37°C angezogen. Durch einen immunologischen Nachweis der in die Cytoplasmamembran eingebauten Strep-BetP-Proteine konnte mit Hilfe des Streptavidin-AP-Konjugats festgestellt werden, dass bei beiden Temperaturen

gleich viel Strep-BetP in die Membran eingebaut wurde (Daten nicht gezeigt). In der Folge wurden die Zellen immer bei 37°C angezogen. Da sich die kinetischen und osmoregulatorischen Eigenschaften von Strep-BetP im Vergleich zu BetP nicht voneinander unterschieden (Morbach, persönliche Mitteilung), konnte Strep-BetP zur Charakterisierung des Proteins in Liposomen verwendet werden.

3.1.2 Optimierung der Reinigung von Strep-BetP mit der StrepTactin-Affinitätschromatographie

Strep-BetP synthetisierende *E. coli*-Zellen (DH5 α mc r pASK-IBA5-*betP*) wurden mit einer „French Press“ oder Ultraschall aufgeschlossen, die Membranen isoliert und mit Dodecylmaltosid solubilisiert. Die Isolierung von Strep-BetP erfolgte über eine Säule aus StrepTactin-Sepharose, an das Strep-BetP spezifisch bindet. Die Bedingungen während der Membransolubilisierung und Isolierung von Strep-BetP wurden optimiert in Bezug auf Reinigungserfolg und Transportaktivität des anschließend in Liposomen rekonstituierten Strep-BetP.

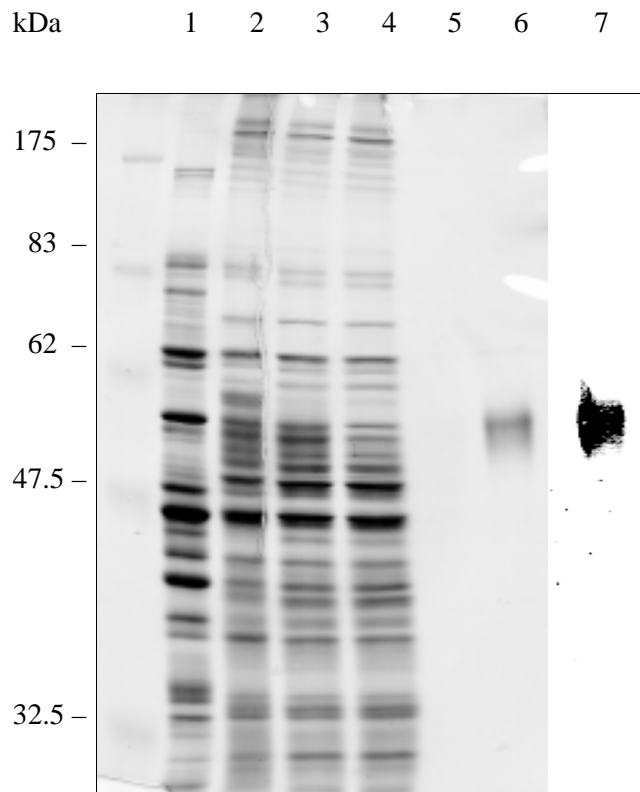


Abbildung 5: Isolierung von Strep-BetP. Der Nachweis der Proteine bzw. von Strep-BetP erfolgte anschließend an eine SDS-PAGE entweder mittels einer Silberfärbung (Spur 1-6) bzw. spezifisch mit dem Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat (Spur 7). Spur 1: Induzierte Zellen (15 μ g Protein), Spur 2: Membranvesikel (15 μ g), Spur 3: Solubilisierete Membranproteine (15 μ g), Spur 4: Durchlauf (15 μ g), Spur 5: Letzte Waschfraktion (0,1 μ g), Spur 6 und 7: Elutionsfraktion (1 μ g).

Tabelle 4: Durchgeführte Optimierungen während der Reinigung und Rekonstitution von Strep-BetP. Als Kriterium wurden die erzielten Glycinbetain-Aufnahmeraten in Proteoliposomen verwendet, wobei jeweils nur die Aufnahmeraten innerhalb eines Optimierungsschrittes miteinander verglichen wurden. Die für weitere Messungen gewählten Werte sind fett gedruckt.

<u>Optimierungen der Rekonstitution und Transportmessungen</u>	<u>Getestete Variationen (in Klammern: relative GB-Aufnahmerate)</u>	<u>Bemerkungen</u>
Detergenz während der Solubilisierung und Proteinreinigung	Dodecylmaltosid (100%) Triton X-100 (70%)	
Glyceringehalt während der Solubilisierung und Proteinreinigung	0% (70%) 8,6% (100%) 17,2% (40%)	Die ungeraden Glycerinkonzentrationen ergeben sich, weil mit einer 86%-igen Stocklösung gearbeitet wurde.
Verwendete Triton X-100 – Menge für die Teilsolubilisierung der Liposomen vor der Rekonstitution (Abbildung 6)	0,25 µl/mg Lipid (50%) 0,5 µl/mg Lipid (100%) 1,0 µl/mg Lipid (95%)	Mit 1 µl/mg Lipid Triton X-100 wurden höhere Proteineinbauraten in die Liposomen erzielt als mit 0,5 µl/mg Lipid Triton X-100.
Lipid-Protein-Verhältnis (LPR)	20:1 (100%) 30:1 (100%) 100:1 (25%)	Um weniger Protein einsetzen zu müssen, wurde ein LPR von 30:1 verwendet.
Valinomycinkonzentration während der Transportmessung	0 µM (15%) 0,1 µM (30%) 0,125 µM (40%) 0,25 µM (60%) 0,5 µM (100%)	Um über einen längeren Zeitraum eine <u>konstante</u> Glycinbetain-Aufnahme messen zu können, wurden 0,1 µM Valinomycin eingesetzt.

Bei der Auswahl des Detergenz während der Solubilisierung der Membranen und der Proteinreinigung wurde gezeigt, dass die Verwendung von Dodecylmaltosid gegenüber Triton X-100 zu höheren Transportaktivitätsraten führte (Tabelle 4).

Im Laufe der Optimierung der Proteinreinigung wurden neben Strep-BetP anfangs auch unspezifische Proteine mit angereichert. Da eine hohe Salzkonzentration während der Reinigung eine unspezifische Bindung von Proteinen an das Säulenmaterial vermindert, wurde Strep-BetP in der Folge in Anwesenheit von 200 mM NaCl isoliert. Der Erfolg der

Reinigung von Strep-BetP ist in Abbildung 5 dokumentiert. Pro Liter Zellkultur konnten 1,3 g Zelltrockengewicht erzielt werden, aus denen circa 600 µg Strep-BetP isoliert werden konnten; dies entsprach circa 3% der Membranproteinmenge. Die maximale Proteinkonzentration, die im Eluat der StrepTactin-Säule erzielt werden konnte, lag bei 3,2 mg/ml.

Zur weiteren Optimierung der Solubilisierung und Proteinreinigung wurde der Glyceringehalt während dieser Schritte variiert. Es wurde gezeigt, dass ein Glyceringehalt von 8,6% in den verwendeten Puffern zu höheren Transportaktivitätsraten führte als ein Glyceringehalt von 0% oder 17,2% Glycerin (Tabelle 4).

Die Konzentration von Dodecylmaltosid während der Proteinreinigung hatte entscheidenden Einfluss auf die Lagerfähigkeit des isolierten Strep-BetP. Wurde Strep-BetP nach der Reinigung in Anwesenheit von 0,1% Dodecylmaltosid eingefroren, zeigten die Proteoliposomen die gleiche Transportaktivität wie Proteoliposomen, die mit zuvor nicht eingefrorenem Strep-BetP rekonstituiert wurden. Wurde Strep-BetP jedoch in Anwesenheit von nur 0,04% Dodecylmaltosid eingefroren, konnte nach der Rekonstitution keine Transportaktivität der Proteoliposomen mehr beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.3 Optimierung der Rekonstitution von Strep-BetP in *E. coli*-Liposomen

Ein entscheidendes Kriterium zur Optimierung der Rekonstitution von Membranproteinen ist das Ausmaß der Teilsolubilisierung der Liposomen vor der Rekonstitution (Rigaud *et al.*, 1995). Deshalb wurden Trübungsmessungen durchgeführt, in denen *E. coli*-Liposomen mit Triton X-100 sukzessiv solubilisiert wurden (Abbildung 6). Es wurde gezeigt, dass eine Teilsolubilisierung der Liposomen mit 1 µl/mg Lipid Triton X-100 für die Rekonstitution optimal war. Eine Teilsolubilisierung der Liposomen mit 0,5 µl/mg Lipid Triton X-100 ergab zwar leicht höhere Transportaktivitätsraten, dennoch wurde 1 µl/mg Lipid Triton X-100 eingesetzt, weil mit dieser Konzentration höhere Proteineinbauraten erzielt wurden (Tabelle 4).

Ein oft sehr entscheidendes Kriterium für eine erfolgreiche Rekonstitution ist das Lipid-Protein-Verhältnis (LPR; w/w). Für BetP erwiesen sich vergleichsweise niedrige LPRs von 20:1 oder 30:1 als günstigstes Verhältnis (Tabelle 4). In allen folgenden Versuchen wurde mit einem LPR von 30:1 gearbeitet, da hier weniger Protein eingesetzt werden musste als bei einem LPR von 20:1. Nach erfolgter Rekonstitution konnten in den Proteoliposomen circa $75 \pm 20\%$ des eingesetzten Proteins nachgewiesen werden.

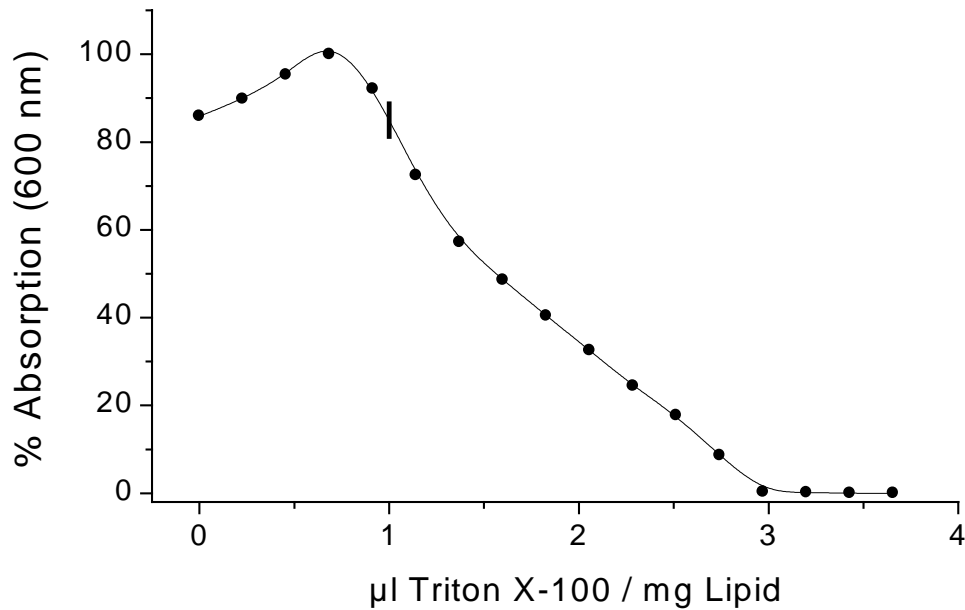


Abbildung 6: Trübungsmessung mit *E. coli*-Liposomen. Die Grafik veranschaulicht die Solubilisierungsintensität durch Zugabe verschiedener Mengen Triton X-100. In der Regel wurde für die Rekonstitution 1 µl Triton X-100 pro mg Lipid eingesetzt; dadurch wurden die Liposomen zu 15% solubilisiert (senkrechter Balken).

3.2 Charakterisierung von Strep-BetP in Proteoliposomen

Um zu überprüfen, inwiefern Strep-BetP in Proteoliposomen über die gleichen Eigenschaften verfügt wie BetP in *C. glutamicum* bzw. *E. coli*, wurden dessen kinetischen und osmoregulatorischen Eigenschaften untersucht.

3.2.1 Glycinbetainaufnahme und Transportspezifität von Strep-BetP in Proteoliposomen.

Die GB-Aufnahmerate von Strep-BetP in Proteoliposomen liegt bei 1200 nmol GB / (min·mg Protein) (Abbildung 7). Eine Linearität der Aufnahmerate wurde nur innerhalb der ersten zehn Sekunden beobachtet, weshalb bei folgenden Transportmessungen meistens nur die Glycinbetainaufnahme nach fünf und zehn Sekunden gemessen wurde. Der Nullwert für die GB-Aufnahmemessung wurde aus den Messpunkten nach fünf und zehn Sekunden extrapoliert, da der Nullwert nicht direkt gemessen werden konnte. Der ermittelte Nullwert entsprach dem Wert, der ohne angelegtes elektrochemisches Na⁺-Potenzial (3.2.3) ermittelt wurde. Die Linearität der GB-Aufnahme während der ersten zehn Sekunden konnte nur erzielt werden, wenn zum Aufbau eines Membranpotenzials nicht mehr als 0,1 µM Valinomycin zum Ansatz gegeben wurden (Tabelle 4).

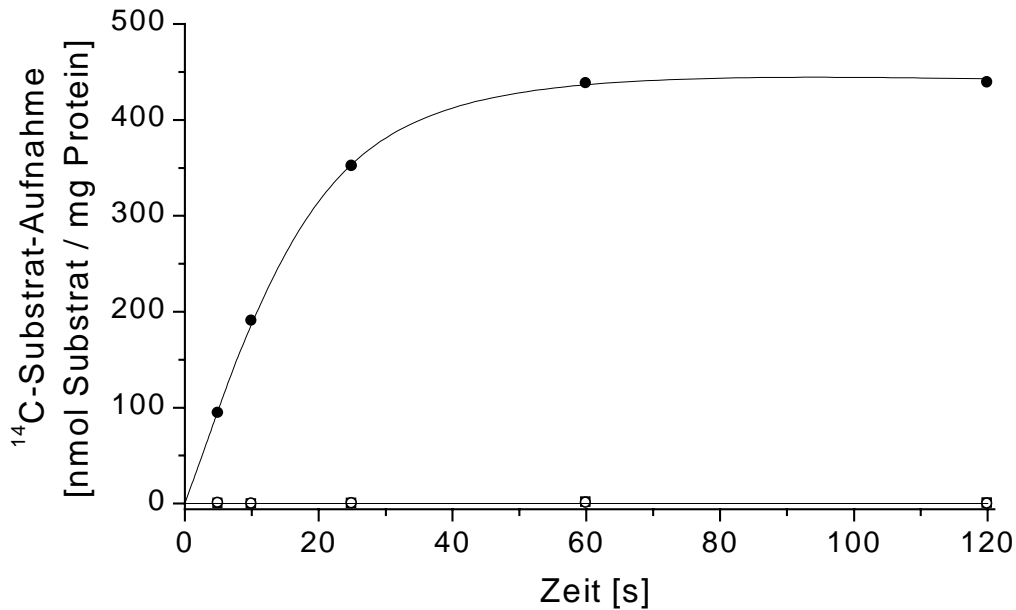


Abbildung 7: Glycylbetainaufnahme und Transportspezifität von Strep-BetP in Proteoliposomen. Als externer Puffer wurde 100 mM Tris/Mes (pH 7,5), 250 mM NaCl (600 mosm) verwendet, der 15 μ M eines 14 C-markierten kompatiblen Solutis enthielt: Glycylbetain (ausgefüllte Kreise), Prolin (Quadrate) oder Ectoin (leere Kreise). Als interner Puffer wurde 100 mM KP_i (pH 7,5) (250 mosm) verwendet.

Sowohl in *C. glutamicum* als auch in *E. coli* wurde eine sehr hohe Spezifität von BetP für Glycylbetain beschrieben (Farwick *et al.*, 1994; Peter, 1998; Burger, 1999). Auch im rekonstituierten System konnte die Spezifität von Strep-BetP für Glycylbetain nachgewiesen werden, da im Gegensatz zu Prolin und Ectoin nur Glycylbetain transportiert wurde (Abbildung 7).

3.2.2 K_M - und V_{max} -Werte für Glycylbetain und Na^+ in Proteoliposomen

Die Messungen zur Bestimmung der K_M - und V_{max} -Werte für Glycylbetain und Na^+ sind in Abbildung 8 und Tabelle 5 zusammengefasst. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die K_M -Werte der beiden Substrate nur wenig von denen in intakten Zellen unterscheiden; der K_M -Wert für Glycylbetain liegt bei 3,6 μ M und ist damit etwas niedriger als in intakten Zellen, der K_M -Wert für Na^+ liegt bei 15 mM und ist damit etwas höher als in intakten Zellen. Die geringen Unterschiede der kinetischen Eigenschaften von BetP in intakten Zellen und Proteoliposomen bestätigen, dass Proteoliposomen ein geeignetes Messsystem sind, um BetP detailliert zu untersuchen.

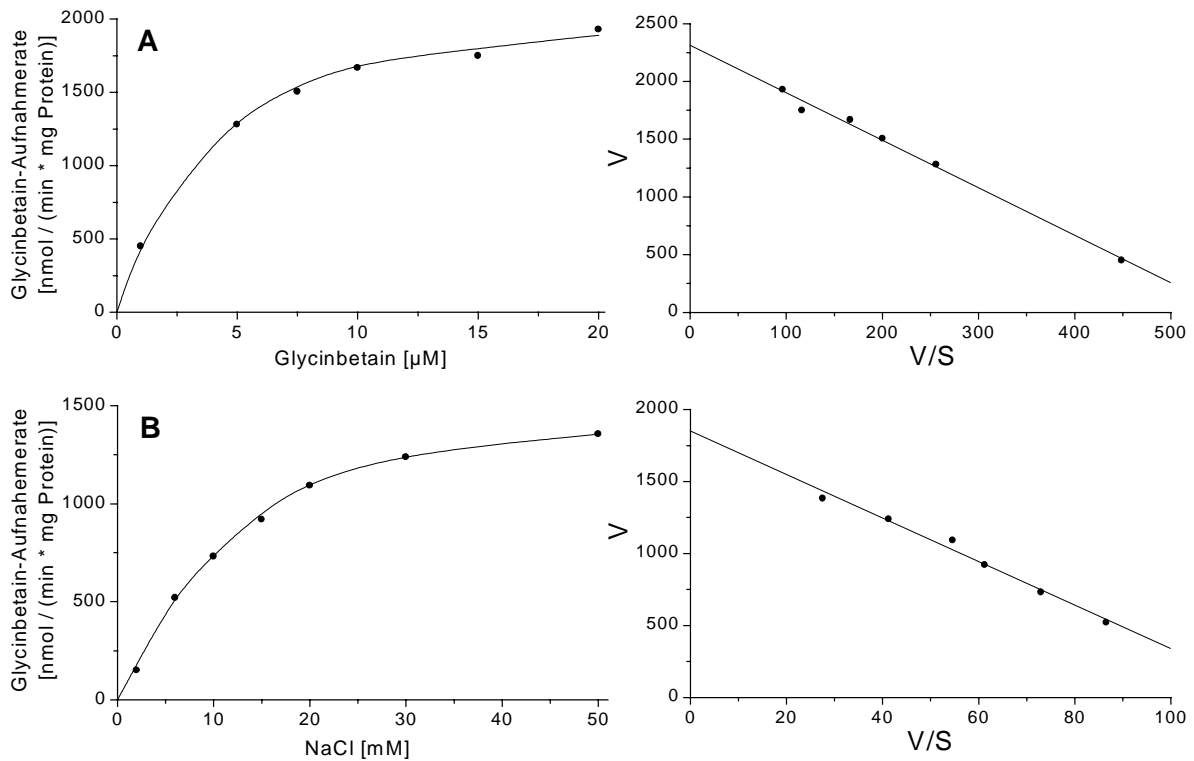


Abbildung 8: Kinetische Parameter von BetP in Liposomen. Bestimmung der K_M - und V_{max} -Werte für Glycinbetain und Na^+ (Tabelle 5). Als externer Puffer wurde 100 mM Tris/Mes (pH 7,5) mit 250 mM NaCl (A) bzw. 500 mM Sorbitol (B) verwendet. Die jeweils nebenstehenden Abbildungen zeigen die dazugehörigen Eadie-Hofstee-Plots der Datenpunkte.

Tabelle 5: Vergleich der kinetischen Parameter von BetP in ganzen Zellen und Proteoliposomen.

Aufnahmesystem	K_M (GB) in μM	V_{max} (GB)	K_M (Na^+) in mM
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 (Farwick <i>et al.</i> , 1995)	$8,6 \pm 0,4$	110 nmol / (min * mg TG)	$4,1 \pm 0,4$
<i>E. coli</i> MKH13/pHP3 (Peter <i>et al.</i> , 1996)	$12,8 \pm 1,2$	55 nmol / (min * mg TG)	$6,1 \pm 1,2$
Proteoliposomen (<i>E. coli</i> -Phospholipide)	$3,6 \pm 0,5$	2300 nmol / (min * mg Protein)	$15,0 \pm 1,5$

3.2.3 Abhängigkeit der Transportaktivität vom chemischen und elektrischen Potenzial

Die Transportaktivität von BetP in *C. glutamicum* ist sowohl vom chemischen Na^+ -Potenzial als auch vom elektrischen Potenzial abhängig (Farwick *et al.*, 1995). Proteoliposomen stellen ein ideales Messsystem für eine detaillierte Charakterisierung dieser beiden Triebkräfte dar, weil die Bedingungen auf beiden Seiten der Membran variiert werden können (Abbildung 9).

So ist es zum Beispiel möglich, die Abhängigkeit vom chemischen Na^+ -Potenzial bzw. elektrischen Potenzial separat voneinander zu untersuchen. Um die Abhängigkeit vom chemischen Na^+ -Potenzial messen zu können, wurde sowohl innerhalb als auch außerhalb der Proteoliposomen die K^+ -Konzentration konstant bei 175 mM gehalten, so dass kein K^+ -Diffusionspotenzial (elektrisches Potenzial) aufgebaut werden konnte. Der Na^+ -Gradient über der Membran wurde aufgebaut, indem die interne Na^+ -Konzentration auf 1 mM eingestellt wurde und die äußere Na^+ -Konzentration zwischen 10 und 100 mM variiert wurde (Abbildung 9A). Die Ergebnisse zeigen, dass die Aufnahme von Glycinbetain vom chemischen Na^+ -Potenzial und unabhängig vom elektrischen Potenzial getrieben werden kann.

Der Einfluss des elektrischen Potenzials wurde durch den Aufbau unterschiedlicher K^+ -Diffusionspotenziale untersucht. Während die Na^+ -Konzentration auf beiden Seiten der Membran bei 50 mM und die interne K^+ -Konzentration bei 175 mM gehalten wurde, wurde die externe K^+ -Konzentration zwischen 175 und 1,75 mM variiert. Dadurch wurde ein K^+ -Diffusionspotenzial aufgebaut, das nach Zugabe des K^+ -Ionophors Valinomycin die

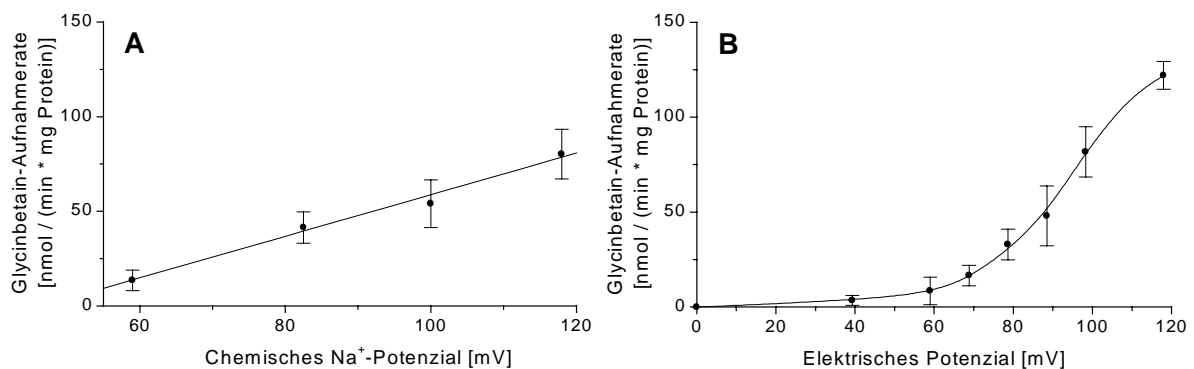


Abbildung 9: Abhängigkeit der Transportaktivität vom chemischen und elektrischen Potenzial.

Abhängigkeit der GB-Aufnahme vom Na^+ -Gradienten (A), K^+ -Diffusionspotenzial (B) oder einer Kombination von beidem (C). Als interner Puffer wurde 100 mM KP_i (pH 7,5) verwendet, der 1 mM (A und C) oder 50 mM NaCl (B) enthielt. Als externer Puffer wurde 100 (A) oder 3,15 mM (C) KP_i (pH 7,5) verwendet, der 10, 25, 50 oder 100 mM NaCl enthielt. In B wurden extern 50 mM NaCl verwendet, wobei die Konzentration des KP_i -Puffers (pH 7,5) zwischen 100 und 1 mM variierte. Der externe Puffer wurde jeweils mit Sorbitol auf eine Osmolalität von 500 mosm eingestellt. Da die in A und C beschriebenen Versuche nur unter nicht- Na^+ -sättigenden Bedingungen durchgeführt werden konnten, wurden deren Werte auf Na^+ -sättigende Bedingungen umgerechnet, wobei der K_M (Na^+) von 15 mM verwendet wurde. Alle Versuche wurden in Anwesenheit von 0,1 μM Valinomycin durchgeführt.

Glycinbetainaufnahme angetrieben hat. Die GB-Aufnahmerate wurde gegen das berechnete Nernst'sche Potenzial aufgetragen, wobei eine lineare Abhängigkeit zwischen 80 und 110 mV beobachtet wurde (Abbildung 9B).

Um beide Triebkräfte zu kombinieren, wurde der K^+ -Gradient konstant gehalten. Die interne K^+ -Konzentration betrug 175 mM, die externe 5,5 mM; dies entsprach einem elektrischen Potenzial von 90 mV. Der Na^+ -Gradient wurde variiert, indem die interne Na^+ -Konzentration auf 1 mM eingestellt und die externe Na^+ -Konzentration zwischen 10 und 100 mM variiert wurde; dies entsprach einem chemischen Potenzial von 60 bis 120 mV (Abbildung 9C). Unter diesen Bedingungen wurde der gleiche relative Anstieg der GB-Aufnahmerate beobachtet wie bei der alleinigen Ausnutzung des chemischen Potenzials (Abbildung 9, A im Vergleich zu C), jedoch ausgehend von einer erheblich höheren Basisaktivität, verursacht durch die Triebkraft des elektrischen Potenzials.

3.2.4 Einfluss der externen Osmolalität auf die Aktivitätsregulation von BetP

Sowohl in *C. glutamicum* als auch in *E. coli* wurde gezeigt, dass die GB-Aufnahmerate durch BetP von der Osmolalität des umgebenden Mediums abhängig ist, wobei das Aktivitätsoptimum in *C. glutamicum* bei 1350 mosm und in *E. coli* bei 600 mosm lag (Peter *et al.*, 1996;

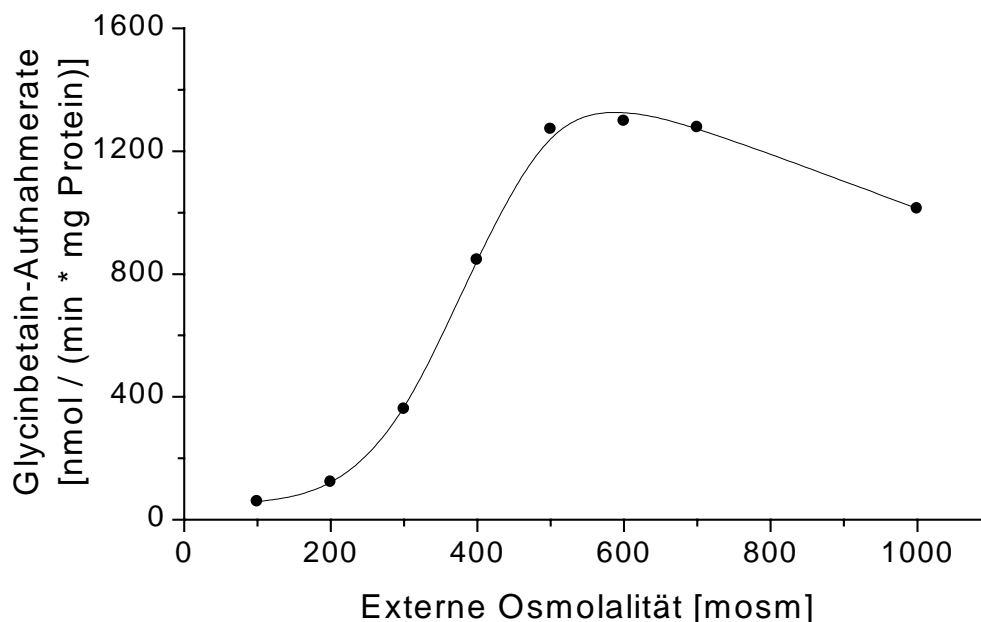


Abbildung 10: Einfluss der externen Osmolalität auf die Aktivitätsregulation von BetP. Als externer Puffer wurde 20 mM NaP_i (pH 7,5), 25 mM NaCl (100 mosm) verwendet, der mit NaCl auf eine Osmolalität zwischen 100 und 1000 mosm eingestellt wurde. Als interner Puffer wurde 76 mM KP_i (pH 7,5) (200 mosm) verwendet, wobei die interne K^+ -Konzentration nach Zugabe der Proteoliposomen zum externen Puffer rechnerisch Werte zwischen 67,5 und 675 mM erreichte (vergleiche Abbildung 17).

Peter *et al.*, 1998a). Messungen der GB-Aufnahmerate mit Proteoliposomen in Abhängigkeit der externen Osmolalität haben gezeigt, dass BetP auch in diesem reduzierten System als Osmosensor und Osmoregulator arbeitet (Abbildung 10), wobei die maximale GB-Aufnahmerate unter den hier gewählten Bedingungen bei 500 mosm erreicht wurde.

3.3 Eingrenzung der möglichen BetP-aktivierenden Reize

Sowohl in ganzen Zellen als auch in Proteoliposomen wurde gezeigt, dass die Aktivitätsregulation von BetP von der externen Osmolalität abhängig ist (Peter *et al.*, 1996; Abbildung 10). Wenn die externe Osmolalität erhöht wird, werden gleichzeitig zahlreiche weitere Faktoren verändert, die alle für den oder die BetP-aktivierenden Reiz(e) in Frage kommen: Volumenverringerng der Proteoliposomen (erhöht gleichzeitig die Membranspannung), Erhöhung der internen Osmolalität, Erhöhung der internen Ionenstärke, Erhöhung der internen Kationenkonzentration, Erhöhung der internen K^+ -Konzentration. Ein großer Vorteil des Proteoliposomensystems ist, dass die erwähnten Parameter in diesem System isoliert betrachtet werden können, wodurch es möglich wird, den BetP-aktivierenden Reiz zu ermitteln.

3.3.1 Einfluss der Volumenverringerng der Proteoliposomen

Durch Anlegen eines hyperosmolalen Stresses wird, hervorgerufen durch einen sofortigen Wasserausstrom, eine Volumenverringerng der Proteoliposomen verursacht. Um zu untersuchen, ob die dadurch verursachte Erhöhung der Membranspannung der für die Aktivierung von BetP erforderliche Reiz ist, wurden Volumenverringerngen unter zwei verschiedenen Bedingungen induziert. In der ersten Versuchsreihe wurde die anfängliche KP_i -Konzentration im Inneren der Proteoliposomen, d.h. die KP_i -Konzentration, die vor dem Anlegen des hyperosmolalen Stresses vorlag, konstant gehalten. Durch Variation der externen Osmolalität konnten verschieden starke Volumenreduzierungen induziert und damit auch unterschiedliche interne KP_i -Konzentrationen eingestellt werden. Im Gegensatz dazu wurden die Bedingungen in der zweiten Versuchsreihe so gewählt, dass nach der Volumenverringerng gleiche interne KP_i -Konzentrationen eingestellt wurden. Dies wurde durch die Wahl unterschiedlicher anfänglicher interner KP_i -Konzentrationen im Inneren der Proteoliposomen möglich. Durch diese Versuchsbedingungen lag die interne KP_i -Konzentration nach Anlegen des hyperosmo-

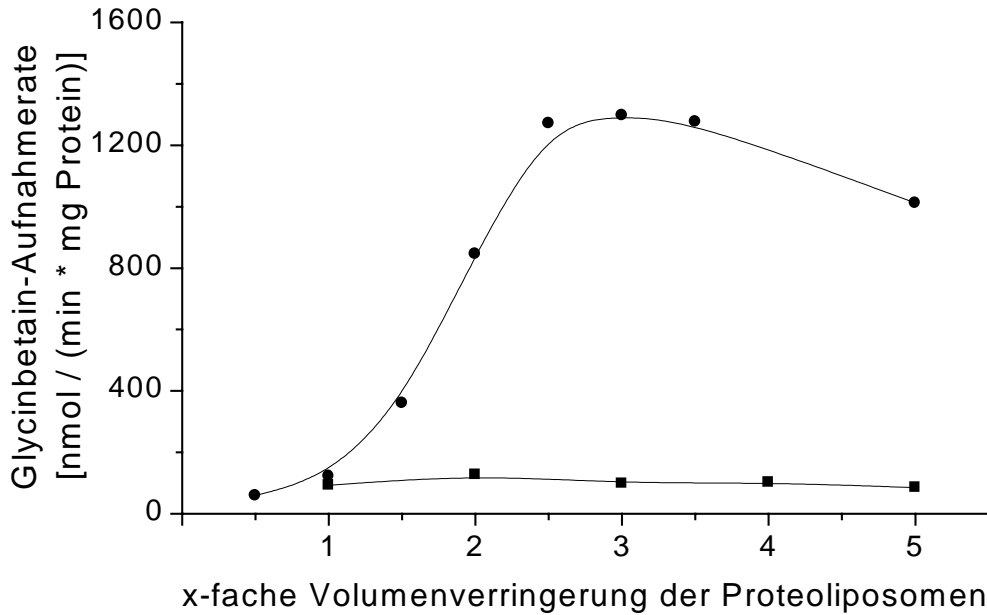


Abbildung 11: Einfluss der Volumenverringerng der Proteoliposomen auf die Aktivitätsregulation. Der interne Puffer der Proteoliposomen enthielt 76 mM KP_i (Kreise; Daten aus Abbildung 10) oder 76, 38, 25, 19 bzw. 15 mM KP_i (Quadrate; anfängliche Osmolalität: 200, 100, 67, 50 bzw. 40 mosm). Der externe Basispuffer enthielt 20 mM NaP_i (pH 7,5), 25 mM NaCl (100 mosm) und wurde mit zusätzlichem NaCl auf eine Osmolalität von 200 mosm (Quadrate) oder zwischen 100 und 1000 mosm (Kreise) eingestellt.

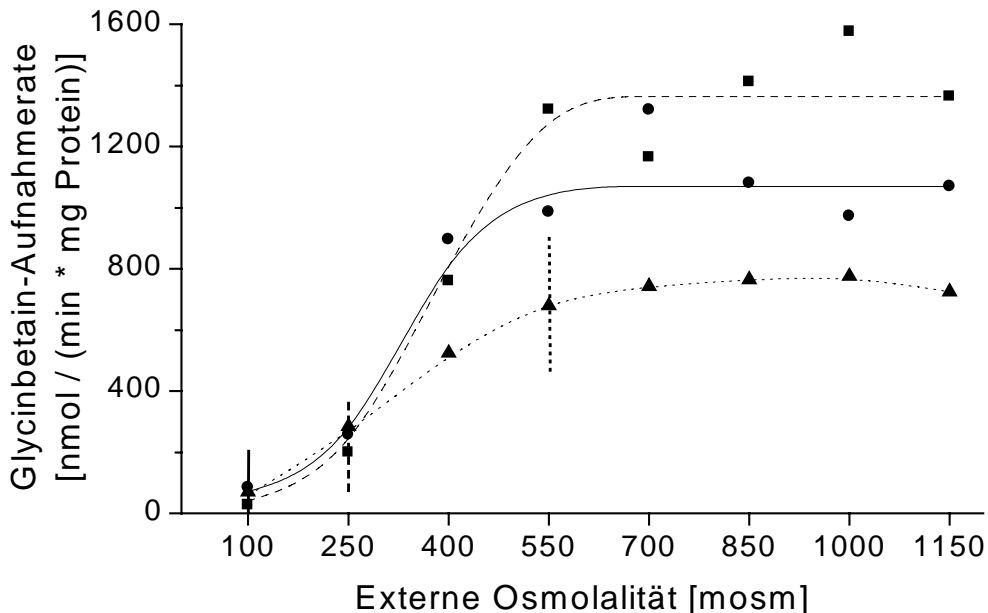


Abbildung 12: Aktivierung von BetP ohne Volumenverringerng der Proteoliposomen. Der interne Basispuffer der Proteoliposomen enthielt 38 mM KP_i (pH 7,5; 100 mosm), der mit KGlu auf anfängliche interne Osmolalitätswerte von 100 (Kreise), 250 (Quadrate, gestrichelte Linie) oder 550 (Dreiecke, gepunktete Linie) mosm eingestellt wurde. Der externe Basispuffer enthielt 20 mM NaP_i (pH 7,5), 25 mM NaCl (100 mosm) und wurde mit zusätzlichem NaCl auf Osmolalitätswerte zwischen 100 und 1150 mosm (Dreiecke) eingestellt.

lalen Stresses in allen Proteoliposomen bei 76 mM. Die Ergebnisse zeigen, dass die Proteoliposomen der zweiten Versuchsreihe keine Aufnahmeaktivität zeigen, während die der ersten Versuchsreihe in Abhängigkeit der externen Osmolalität Glycinbetain aufnehmen (Abbildung 11). Dadurch wurde gezeigt, dass eine Erhöhung der Membranspannung, die durch eine Volumenverringerng der Proteoliposomen verursacht wird, die Aktivität von BetP nicht erhöht.

Um diese Aussage zu bestätigen, wurden Proteoliposomen mit unterschiedlicher interner Osmolalität verschiedenen externen Osmolalitäten ausgesetzt (Abbildung 12). Das Ergebnis zeigt, dass unabhängig von der mit KGlu eingestellten internen Osmolalität die externe Osmolalität, bei der das Aktivitätsmaximum erreicht wurde, bei 550 mosm liegt. Dieser Versuch bestätigt, dass für eine Aktivierung von BetP keine Volumenverringerng der Proteoliposomen notwendig ist, sondern dass dafür eine Variation der externen oder internen Bedingungen ausschlaggebend sein muss.

3.3.2 Einfluss der externen Osmolalität *per se*

Um den Einfluss der externen Osmolalität *per se* zu untersuchen, wurden zunächst die Auswirkungen von verschiedenen Soluten auf der externen Seite der Proteoliposomen getestet. Dabei wurde Prolin als Beispiel eines Solut ohne Nettoladung und NaCl als Beispiel eines geladenen Solut gewählt. Es wurde gezeigt, dass BetP annähernd gleich stark aktiviert wird, unabhängig davon, ob die externe Osmolalität mit Prolin oder NaCl eingestellt wird (Abbildung 13). Auch wenn die externe Osmolalität mit dem ungeladenen Solut Sorbitol eingestellt wurde, änderten sich die maximale Aufnahme rate sowie die Osmolalität, bei der die maximale Aufnahme rate erreicht wurde, kaum (Daten nicht gezeigt). Als nächstes wurde untersucht, ob die Steigerung der externen Osmolalität für die Aktivierung von BetP ausreicht oder ob diese auch von den internen Bedingungen der Proteoliposomen abhängt. Dazu wurde die Osmolalität von KP_i enthaltenden internen Puffern mit unterschiedlichen Prolin-Konzentrationen erhöht. Wenn eine geringe Menge Prolin im Inneren der Proteoliposomen eingesetzt wurde, war eine höhere externe Osmolalität erforderlich, um BetP zu aktivieren. Wenn noch mehr Prolin im Inneren der Proteoliposomen eingesetzt wurde, konnte nur eine sehr geringe Steigerung der GB-Aufnahme rate bei steigender externer Osmolalität beobachtet werden. (Abbildung 13). Der gleiche Effekt konnte auch mit einer hohen internen Konzentration von Ectoin, Carnitin oder Glukose gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse zeigen, dass (1.) die Aktivierung von BetP sowohl mit ionischen als auch nicht ionischen Soluten im

externen Medium erzielt werden kann, dass (2.) eine Erhöhung der externen Osmolalität *per se* nicht der für die Aktivierung von BetP notwendige Reiz sein kann und dass (3.) die erniedrigte Aktivierung von BetP bei intern vorliegendem Prolin nicht durch eine spezifische Inhibierung durch Prolin erklärt werden kann.

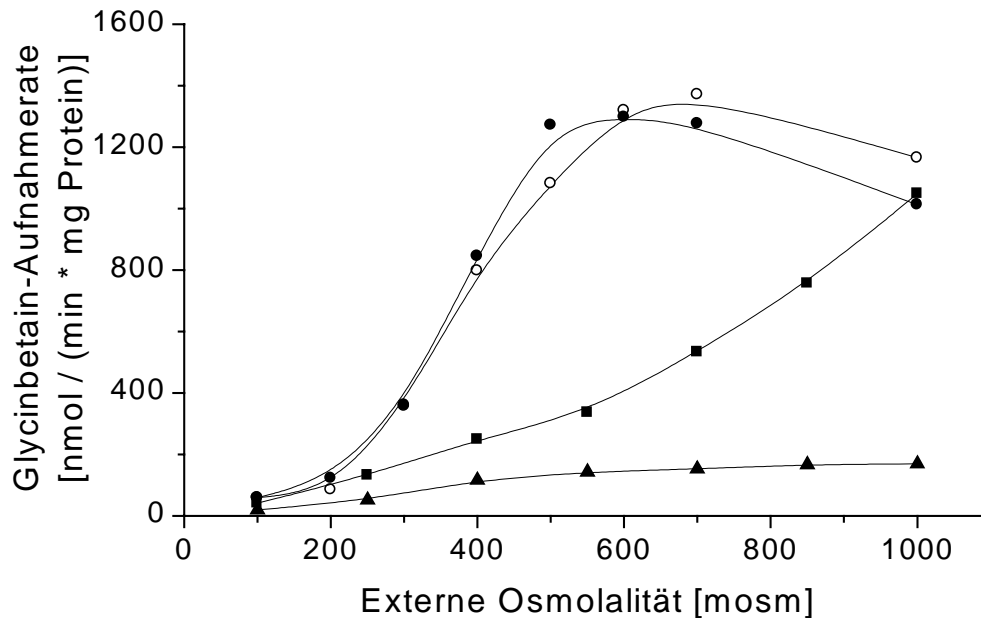


Abbildung 13: Einfluss der externen Osmolalität auf die Osmoregulation. Der externe Basispuffer der Proteoliposomen enthielt 20 mM NaP_i (pH 7,5), 25 mM NaCl (100 mosm) und wurde mit NaCl (ausgefüllte Symbole) oder Prolin (offene Kreise) auf eine externe Osmolalität zwischen 100 und 1000 mosm eingestellt. Kreise: Der interne Puffer der ungestressten Proteoliposomen (76 mM KP_i , pH 7,5) hatte eine Osmolalität von 200 mosm. Quadrate: Der interne Puffer der ungestressten Proteoliposomen (38 mM KP_i , 150 mM Prolin) hatte eine Osmolalität von 250 mosm. Dreiecke: Der interne Puffer der ungestressten Proteoliposomen (38 mM KP_i , 450 mM Prolin) hatte eine Osmolalität von 550 mosm.

3.3.3 Einfluss der internen Osmolalität

Da durch hyperosmolale Stressbedingungen auch die Osmolalität auf der Innenseite der Proteoliposomen erhöht wird, wurde untersucht, ob dieser Effekt der für die Aktivierung von BetP erforderliche Reiz ist. Dazu wurde die interne Osmolalität zum einen mit KP_i und zum anderen mit Prolin eingestellt, ohne dass die Proteoliposomen während eines Versuches eine Volumenänderung erfuhren. Die Daten zeigen, dass steigende interne KP_i -Konzentrationen auch unter jeweils isoosmotischen Bedingungen zu einer Steigerung der GB-Aufnahmerate führen, wobei das Maximum bei einer internen bzw. externen Osmolalität von 500 mosm erreicht wurde. Wenn dagegen die interne Osmolalität mit Prolin eingestellt wurde, konnte nur eine sehr leichte Steigerung der GB-Aufnahmerate beobachtet werden, wobei das Aktivitätsmaximum bei 400 mosm lag (Abbildung 14A). Dadurch wurde gezeigt, dass allein

durch die Anwesenheit von KP_i auf der internen Seite der Proteoliposomen BetP aktiviert wird, während die Anwesenheit von Prolin auf der internen Seite nur zu einer extrem geringen Aktivierung führt. Da in beiden Versuchsreihen die gleiche interne Osmolalität eingestellt wurde, ist auszuschließen, dass BetP durch die interne Osmolalität *per se* aktiviert wird.

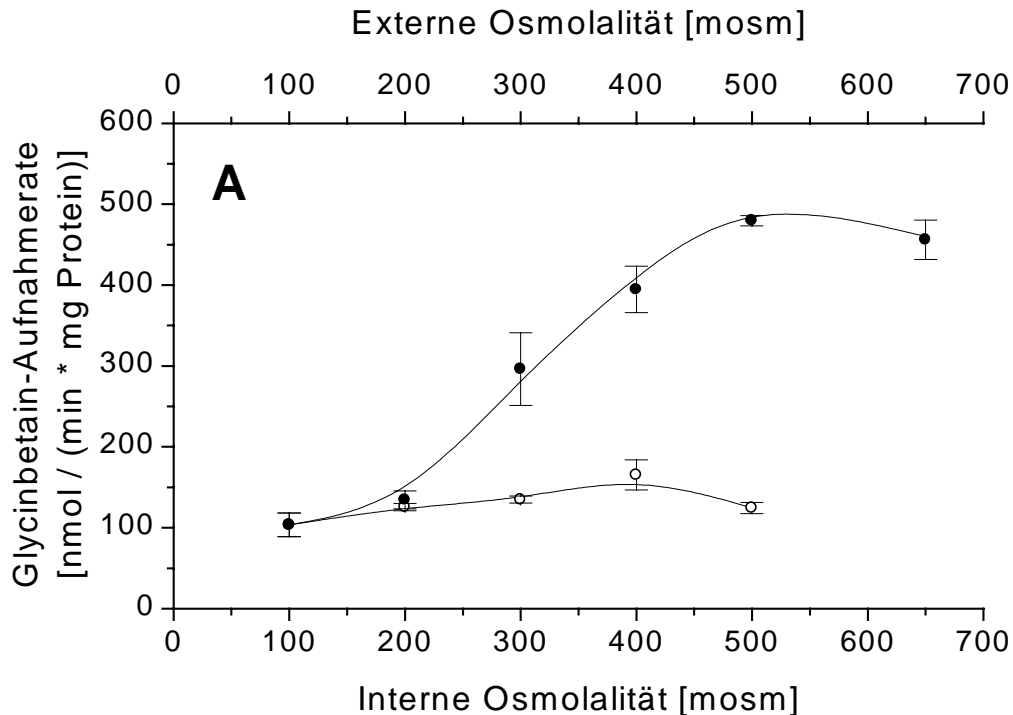
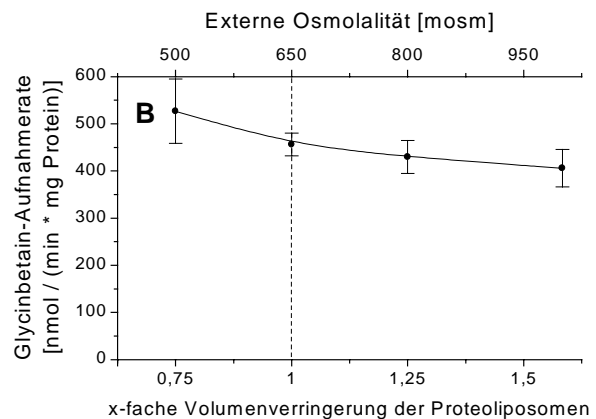


Abbildung 14: Einfluss der internen Osmolalität auf die Aktivitätsregulation von BetP.

(A): Der interne Basispuffer der Proteoliposomen enthielt 38 mM KP_i (pH 7,5) (100 mosm) und wurde mit KP_i (pH 7,5) (ausgefüllte Kreise) bzw. Prolin (leere Kreise) auf Osmolalitätswerte zwischen 100 und 650 bzw. 500 mosm aufgefüllt. Der externe Basispuffer enthielt 20 mM NaP_i (pH 7,5), 25 mM NaCl (100 mosm) und wurde mit NaCl auf Osmolalitätswerte zwischen 100 und 650 bzw. 500 mosm eingestellt. Zu beachten ist, dass in keinem der Versuche das Volumen der Proteoliposomen verändert wurde. (B): Der interne Puffer der Proteoliposomen (250 mM KP_i , pH 7,5) hatte eine Osmolalität von 650 mosm. Der externe Basispuffer enthielt 20 mM NaP_i (pH 7,5), 25 mM NaCl und wurde mit NaCl auf Osmolalitätswerte zwischen 500 und 1000 mosm eingestellt, wodurch die Proteoliposomen ihr Volumen unmittelbar nach dem Start der Aufnahmemessung um den Faktor 0,75 bis 1,54 veränderten. Der Datenpunkt bei 650 mosm ist derselbe wie in Abbildung A.



Auffällig war, dass bei einer internen KP_i -Konzentration von 190 mM (Abbildung 14A, 500 mosm) nur eine maximale GB-Aufnahmerate von circa 500 nmol / (min*mg Protein) erreicht wurde, während diese unter „Standardbedingungen“ bei circa 1300 nmol / (min*mg Protein) lag (Abbildung 10). Eine eventuelle Erklärung dafür sind mögliche Schädigungen der

Proteoliposomen, während diese in einem hochosmolalen Puffer extrudiert wurden. Um jedoch auszuschließen, dass BetP in diesem Versuchsansatz nur teilweise aktiviert wurde und zur vollständigen Aktivierung als additiven Reiz die Membranspannung aus der Phospholipidumgebung benötigte, wurden Proteoliposomen mit bereits aktiviertem BetP hyperosmolalem Stress ausgesetzt (Abbildung 14B). Die Daten zeigen, dass eine Erhöhung der Membranspannung, verursacht durch eine Volumenverringering der Proteoliposomen, nicht zu einer Erhöhung der GB-Aufnahmerate von BetP führt. Darüberhinaus führt eine leicht hypoosmolale Bedingung, die zu einem Einstrom von Wasser führt, sogar zu einem Anstieg der GB-Aufnahmerate.

3.3.4 Einfluss verschiedener interner Solute

In Abbildung 13 wurde gezeigt, dass die Osmoregulation von BetP stark durch das verwendete interne Solut beeinflusst wird. Um die Abhängigkeit der Aktivitätsregulation von der Natur des internen Soluts genauer zu untersuchen, wurden dem internen Puffer der Proteoliposomen KP_i , KGlu, CholinCl oder Glukose zugegeben (Abbildung 15). Um den Einfluss von weiteren Faktoren auszuschließen, wurde in jedem Einzelversuch die gleiche interne und externe Osmolalität gewählt. Da die interne und externe Osmolalität auf jeweils 250 bzw. 625 mosm eingestellt wurde, verringerten die Proteoliposomen ihr Volumen in jedem Versuch um das 2,5-fache. In der Versuchsreihe wurden die internen Prolinkonzentrationen bzw. die internen Konzentrationen der oben genannten Solute variiert. Die Daten zeigen, dass eine Erhöhung der internen Konzentration von KP_i und KGlu zu einer Aktivierung von BetP führte, eine Erhöhung der internen Konzentration von CholinCl und Glukose jedoch nicht (Abbildung 15). Dies spricht dafür, dass neben Prolin auch Glukose und CholinCl nicht in der Lage sind, BetP zu aktivieren. Da BetP auch durch eine Erhöhung der internen KCl-Konzentration aktiviert wird (Abbildung 16) aber nicht durch internes CholinCl, kann ausgeschlossen werden, dass die interne Anionenkonzentration für die BetP-Aktivierung verantwortlich ist. Eine Veränderung des intern eingesetzten Kations hat dagegen erheblichen Einfluss auf die Aktivierung von BetP. Durch die Wahl einer anderen Darstellung, in der die Messwerte gegen die interne Kationenkonzentration, die sich nach dem hyperosmolalen Schock einstellte, aufgetragen wurde, liegen die Aktivierungskurven von KP_i und KGlu relativ genau aufeinander (Abbildung 15B). Auch dies spricht dafür, dass für die Aktivierung von BetP nicht die interne Konzentration von Anionen sondern die von K^+ -Ionen oder eventuell auch die von anderen Kationen verantwortlich ist.

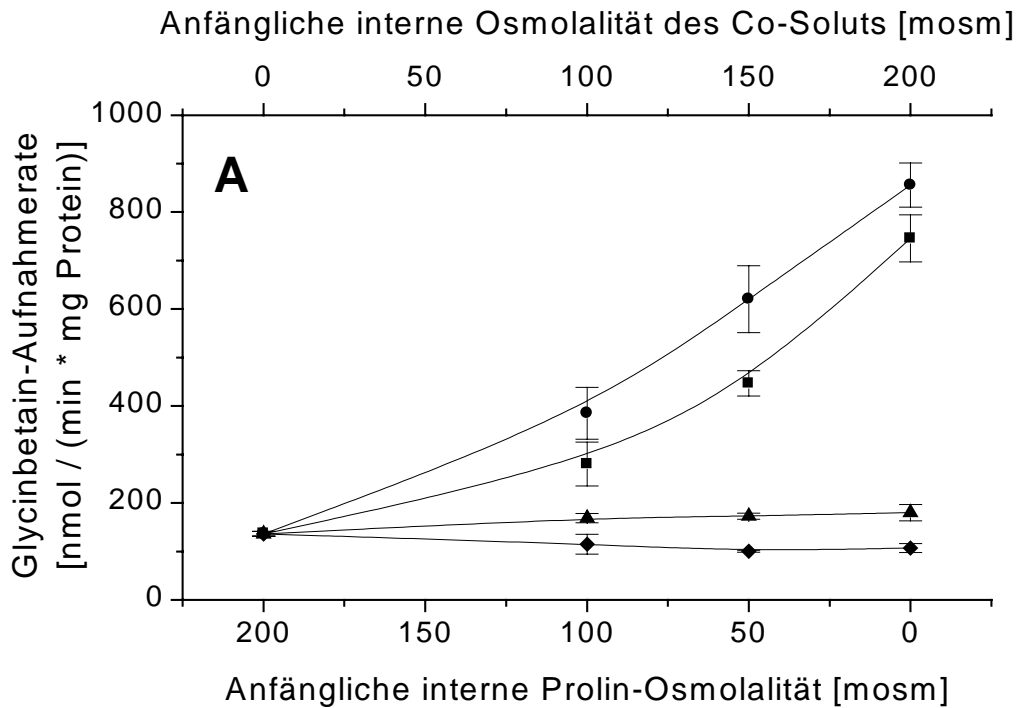
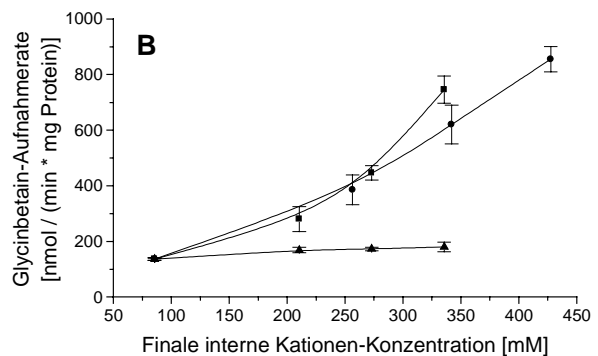


Abbildung 15: Abhängigkeit von der Art des internen Solut.

Der interne Puffer enthielt 19 mM KP_i (pH 7,5) und 200, 150, 100, 50 oder 0 mM Prolin und wurde mit zusätzlichen Soluten auf eine Osmolalität von 250 mosm eingestellt: Kreise: 0, 19, 38, 57 oder 76 mM KP_i (pH 7,5), Quadrate: 0, 25, 50, 75 oder 100 mM KGlu, Dreiecke: 0, 25, 50, 75 oder 100 mM CholinCl, Rauten: 0, 50, 100, 150 oder 200 mM Glukose. Der externe Puffer (20 mM NaP_i (pH 7,5), 290 mM NaCl) hatte eine Osmolalität von 625 mosm. Folglich wurde das

Volumen der Proteoliposomen in jeder Messung jeweils um den Faktor 2,5 verringert. (A): Die Daten sind gegen die von internen Soluten ausgehende Osmolalität aufgetragen, die vor dem hyperosmolalen Stress im Inneren der Proteoliposomen vorlag. (B): Die Daten sind gegen die interne Kationenkonzentration aufgetragen, die sich rechnerisch einstellte, nachdem die Proteoliposomen zum externen Puffer gegeben wurden.



3.3.5 Einfluss unterschiedlicher interner Kationen

Um detaillierter zu bestimmen, welche internen Kationen in der Lage sind BetP zu aktivieren, wurde auf der internen Seite der Proteoliposomen KCl, RbCl, CsCl oder NH_4Cl eingesetzt (Abbildung 16). Zum Vergleich wurden auch Daten aus Abbildung 10, in der GB-Aufnahmeraten von Proteoliposomen mit internem KP_i aufgetragen sind, dargestellt. Die Daten aus Abbildung 16 zeigen, dass mit steigenden internen Konzentrationen von KCl, KP_i , RbCl oder CsCl die GB-Aufnahmerate stieg. Steigende Konzentrationen von internem NH_4Cl dagegen führten zu keiner Aktivierung von BetP. Da das intern vorliegende Ammonium zu

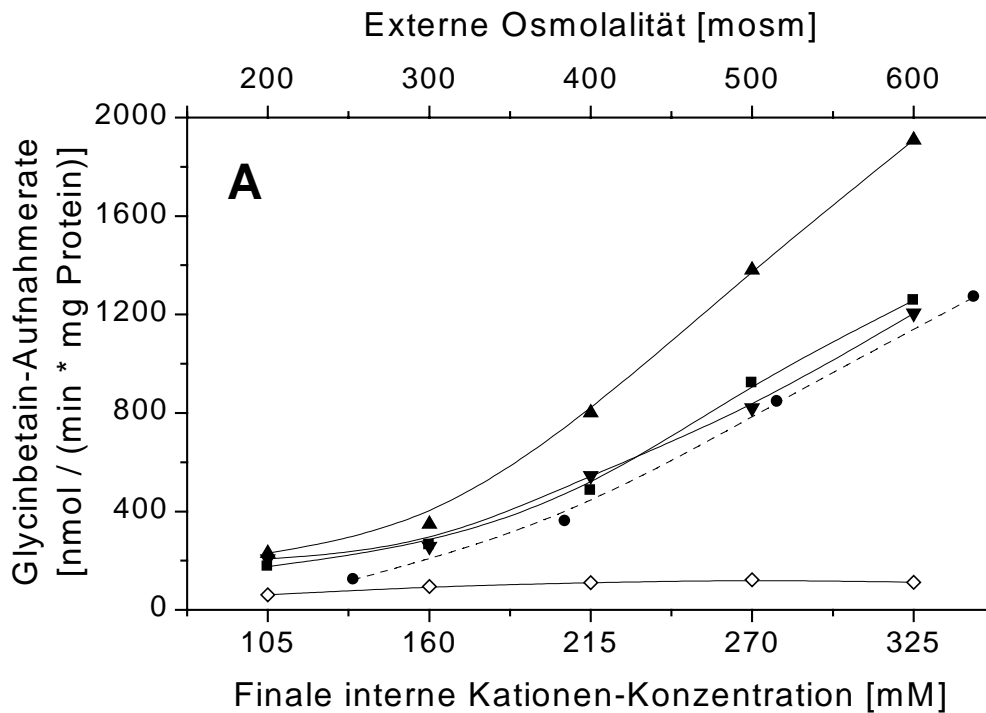
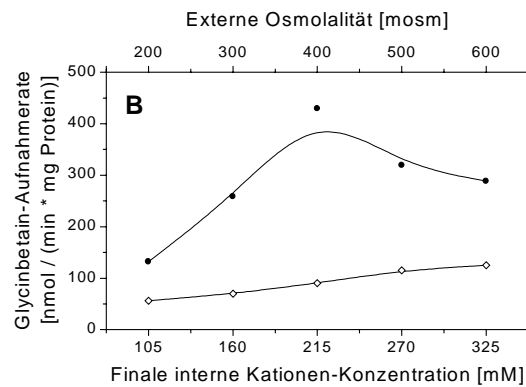


Abbildung 16: Abhängigkeit von der Natur des internen Kations. (A): Der interne Basispuffer der Proteoliposomen enthielt 19 mM KP_i (pH 7,5) und wurde mit KP_i (pH 7,5) (Kreise; Daten aus Abbildung 10) auf eine Osmolalität von 200 mosm oder mit KCl (Quadrate), RbCl (aufrechte Dreiecke), CsCl (umgekehrte Dreiecke) oder NH₄Cl (Rauten) auf eine Osmolalität von 250 mosm eingestellt. Der externe Basispuffer enthielt 20 mM NaP_i (pH 7,5) und wurde mit NaCl auf Osmolalitäts-werte zwischen 200 und 600 mosm eingestellt.



Die mit Kreisen dargestellten Datenpunkte beziehen sich nur auf die interne Kationenkonzentration; die externe Osmolalität betrug zwischen 200 und 500 mosm. (B): Der interne Puffer hatte eine Osmolalität von 250 mosm: 76 mM KP_i (pH 7,5), 25 mM NH₄Cl (Kreise) bzw. 19 mM KP_i (pH 7,5), 100 mM NH₄Cl (Rauten). Der externe Puffer enthielt 20 mM NaP_i (pH 7,5), 25 mM NaCl und wurde mit NH₄Cl auf Osmolalitäts-werte zwischen 200 und 600 mosm eingestellt.

Ammoniak dissoziiert und Ammoniak über die Membran diffundiert, kommt es bei intern eingesetztem NH₄Cl zu einer Ansäuerung im Inneren der Proteoliposomen, wodurch die Transportaktivität stark beeinträchtigt werden könnte. Auch wenn unklar ist, ob es schon innerhalb des Messungszeitraums von 10 sec zu einer erheblichen Änderung des pH-Wertes im Inneren der Proteoliposomen kam, wurde ein Kontrollversuch durchgeführt. Dazu wurde die externe Osmolalität nicht mit NaCl sondern mit NH₄Cl eingestellt (Abbildung 16B). Da in keinem der Versuche mehr als zehnmals soviel NH₄Cl auf der externen im Vergleich zur internen Seite der Membran verwendet wurde, konnte sich der pH-Wert höchstens um eine Einheit ändern. Die Daten zeigen, dass mit niedrigen KP_i- und hohen NH₄Cl-Konzentrationen

im Inneren der Proteoliposomen die GB-Aufnahmerate nur sehr gering war, während Proteoliposomen mit hohen K^+ - und niedrigen NH_4Cl -Konzentrationen im internen Medium zumindest bis zu einer externen Osmolalität von 400 mosm GB-Aufnahmeraten zeigten, die denen in Versuchen mit externem NaCl sehr ähnlich waren. Bei höheren externen Osmolalitätswerten sanken die GB-Aufnahmeraten jedoch ab.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung von BetP in Proteoliposomen von der internen Konzentration an K^+ -Ionen oder K^+ -ähnlicher Ionen abhängig ist. Zur Quantifizierung wurden die Daten aus Abbildung 10 gegen die interne K^+ -Konzentration aufgetragen, die sich in diesem Versuch nach dem hyperosmolalen Stress einstellte (Abbildung 17). Der Bereich der internen K^+ -Konzentration, in dem die GB-Aufnahmerate signifikant ansteigt, liegt zwischen circa 150 und 350 mM, während der Wendepunkt des sigmoiden Bereichs der Kurve bei 250 mM liegt. Um zu überprüfen, inwiefern die Aktivierung von BetP auch in intakten Zellen von der internen K^+ -Konzentration abhängig ist, wurden Versuche in *E. coli*-Zellen durchgeführt.

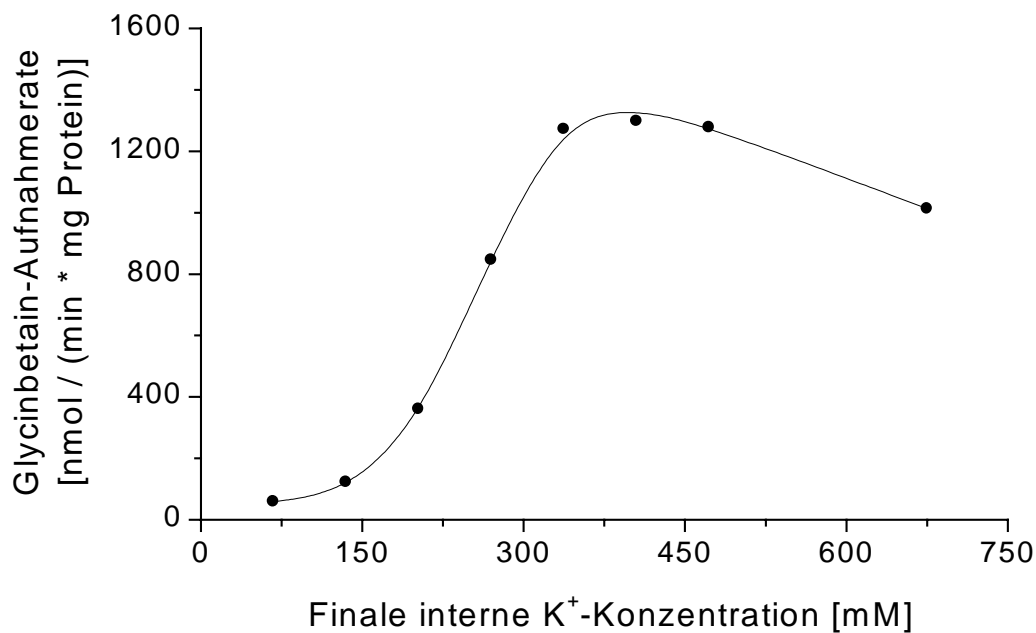


Abbildung 17: Abhängigkeit der BetP-Aktivitätsregulation von der internen K^+ -Konzentration. Die Werte aus Abbildung 10 sind gegen die interne K^+ -Konzentration aufgetragen, die sich rechnerisch einstellte, nachdem die Proteoliposomen zum externen Puffer gegeben wurden.

3.4 Abhängigkeit der BetP-Aktivität in *E. coli*-Zellen von der internen K^+ -Konzentration

Mit Hilfe des Proteoliposomensystems wurde gezeigt, dass die BetP-Aktivität von der internen K^+ -Konzentration abhängig ist. Zur Überprüfung der Relevanz dieser Aussage war es notwendig, diese Abhängigkeit auch *in vivo* nachzuweisen.

3.4.1 Substrataufnahme durch osmotisch unterschiedlich behandelte Zellen

Um zu untersuchen, ob die Aktivität von BetP auch in intakten Zellen von der internen K^+ -Konzentration abhängig ist, wurde versucht, die GB-Aufnahmerate mit verschiedenen internen K^+ -Konzentrationen zu korrelieren. Dazu war es notwendig, Bedingungen zu finden, unter denen die Zellen möglichst viele K^+ -Ionen ausschleusen, um möglichst niedrige interne K^+ -Konzentrationen zu erreichen. Um dies zu erreichen wurden *E. coli*-Zellen in einem Minimalmedium mit einer K^+ -Konzentration von 100 μ M und einer Osmolalität von 500 mosm angezogen. Da *E. coli*-Zellen als Reaktion auf einen hypoosmotischen Stress zur Aufrechterhaltung des Turgors, K^+ -Ionen ins Medium abgeben, wurden die Zellen

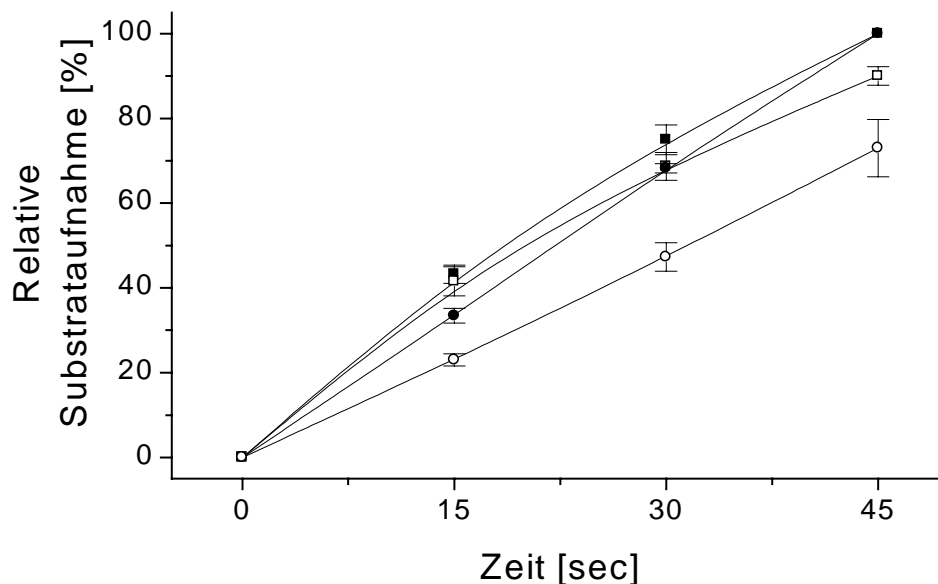


Abbildung 18: Substrataufnahme durch osmotisch unterschiedlich behandelte Zellen. *E. coli* MKH13 pASK-IBA5-*betP* wurde wie unter 2.5.7.3 beschrieben behandelt. Die Zellen wurden während des gesamten Versuches unter isoosmolalen Bedingungen behandelt (500 mosm; ausgefüllte Symbole) bzw. hyperosmolal angezogen (500 mosm), hypoosmolal geschockt (100 mosm gefolgt von 20 mosm) und dann wieder hyperosmolal geschockt (500 mosm) (leere Symbole). Die relativen Aufnahmen von Glycinbetain (Kreise) und Serin (Quadrate) sind aufgetragen, wobei die Substrataufnahmen der isoosmolal behandelten Zellen nach 45 sec jeweils auf 100% gesetzt wurden. Die absoluten Aufnahmeraten lagen bei 51 (ausgefüllte Kreise) bzw. 35 (leere Kreise) nmol GB / (min·mg TG) und bei 9,7 (ausgefüllte Quadrate) bzw. 9,1 (leere Quadrate) nmol Serin / (min·mg TG).

hypoosmolal gestresst, so dass als Folge die K^+ -Konzentration im Cytoplasma abnahm. Da diese Behandlung eventuell Schädigungen der Zellen zur Folge hat, wurde zur Kontrolle auch die Serinaufnahme gemessen, da diese unabhängig von der internen K^+ -Konzentration ist (Kruse, 2000). Als weitere Kontrolle wurden Zellen des gleichen Ansatzes nicht hypoosmolal geschockt sondern isoosmolal gewaschen und resuspendiert und auch während der Aufnahmemessung unter isoosmolalen Bedingungen behandelt. Die höchste GB- bzw. Serinaufnahme wurde bei isoosmolal behandelten Zellen beobachtet (Abbildung 18). Die GB- bzw. Serinaufnahme der zuerst hypo- und dann hyperosmolal behandelten Zellen war jeweils niedriger, wobei die relative Abnahme jedoch unterschiedlich hoch war. Bei der GB-Aufnahme reduzierte sich die Aufnahme auf 69% (von 51 auf 35 nmol / (min·mg TG)), bei der Serinaufnahme auf lediglich 94% (von 9,7 auf 9,1 nmol / (min·mg TG)). Um die Aufnahmeraten in Abhängigkeit der internen K^+ -Konzentration zu betrachten, war es notwendig, diese zu messen. Jedoch waren die gemessenen internen K^+ -Konzentrationen sehr viel niedriger als die theoretisch erwarteten, da es wahrscheinlich nicht möglich ist, unabhängig von den gewählten Versuchsbedingungen, eine niedrigere interne K^+ -Konzentration als 150 mM zu erreichen (Bakker, persönliche Mitteilung).

3.4.2 GB-Aufnahmemessungen mit isoosmolal gewaschenen *E. coli*-Zellen

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Bestimmung der internen K^+ -Konzentration wurde ein Ansatz gewählt, in dem die Zellen weniger manipuliert wurden. Dazu wurde untersucht, ob Zellen, die nie hyperosmotischen Bedingungen ausgesetzt waren, in der Lage sind, Glycinbetain aufzunehmen oder nicht. In der Regel wurden heterolog BetP exprimierende *E. coli*-Zellen, mit denen GB-Aufnahmemessungen durchgeführt wurden, mit einem im Vergleich zum Kulturmedium hypoosmolalen Puffer gewaschen, bevor sie einem hyperosmolalen Stress ausgesetzt wurden (3.7; Peter, 1998; Peter *et al.*, 1998a). Um nun zu überprüfen, wie hoch die GB-Aufnahmerate von BetP exprimierenden *E. coli*-Zellen ist, die zu keiner Zeit einem hyperosmolalen Stress ausgesetzt waren, wurde *E. coli* MKH13 pASK-IBA5-*betP* in LB-Medium (Osmolalität: 450 mosm) angezogen und in isoosmolalem Puffer gewaschen und resuspendiert, bevor GB-Aufnahmemessungen in Medien unterschiedlicher Osmolalität durchgeführt wurden (Abbildung 19). Die Daten zeigen, dass auch hypoosmolal gestresste Zellen signifikante GB-Aufnahmeraten aufwiesen, so dass es für die Aufnahme von Glycinbetain nicht erforderlich war, dass die Zelle eine Volumenverringering erfuhr.

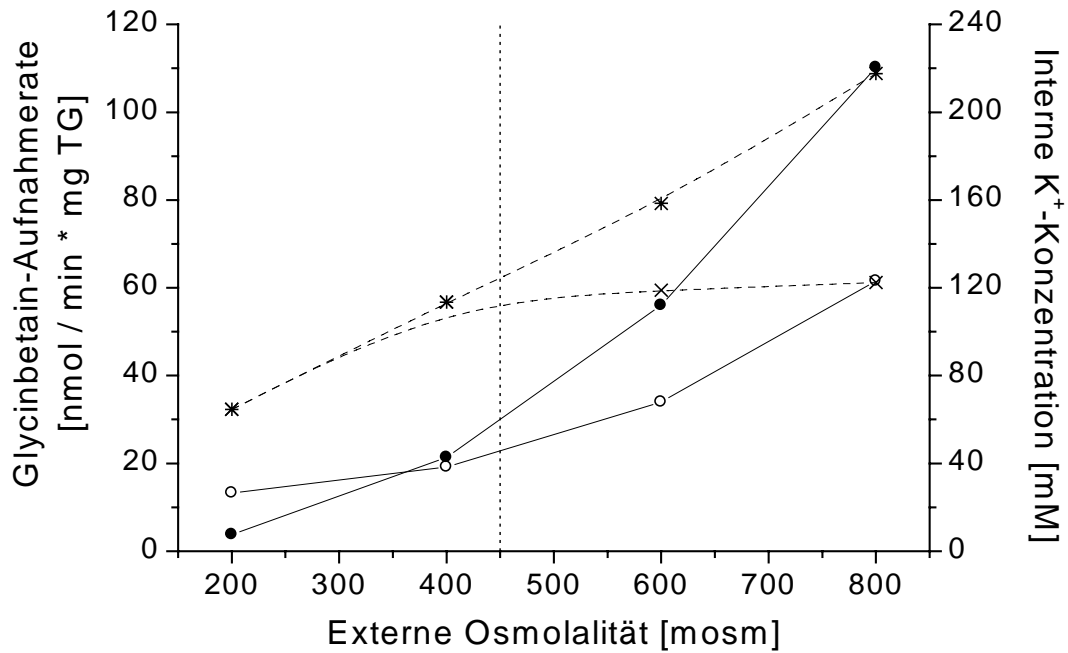


Abbildung 19: Abhängigkeit der GB-Aufnahmerate isoosmolal gewaschener Zellen von der externen Osmolalität. Die GB-Aufnahmerate (durchgezogene Linie) und die interne K⁺-Konzentration der Zellen (gestrichelte Linie) sind aufgetragen. Die gepunktete Linie gibt die Osmolalität der Puffer an, in denen die Zellen angezogen, gewaschen und resuspendiert wurden. *E. coli* MKH13 pASK-IBA5-*betP* wurde wie unter 2.5.7.2 beschrieben behandelt und in 100 mM Tris/Mes (pH 7,5), 330 mM Sorbitol, 10 mM NaCl resuspendiert (450 mosm). Zum Starten der Reaktion wurden 50 µl der Zellen in einem Puffer mit einer bestimmten Osmolalität zwanzigfach verdünnt, so dass eine OD₅₅₀ von circa 1,5 eingestellt wurde. Leere Kreise: Der Puffer enthielt 100 mM Tris/Mes (pH 7,5), 50 mM NaCl und wurde mit Sorbitol auf Osmolalitätswerte zwischen 200 und 800 mosm eingestellt. Ausgefüllte Kreise: Der Puffer enthielt 100 mM Tris/Mes (pH 7,5), 80 mM Sorbitol, 10 mM NaCl und wurde mit äquiosmolalen Mengen von Sorbitol und NaCl auf Osmolalitätswerte zwischen 200 und 800 mosm eingestellt. Kreuze: Interne K⁺-Konzentrationen der osmogestressten Zellen, wobei die Berechnung der Konzentrationen auf der Annahme beruht, dass das cytoplasmatische Volumen 1,6 µl/mg Zelltrockengewicht beträgt. Sterne: Die K⁺-Konzentrationen wurden auf der Grundlage berechnet, dass sich das cytoplasmatische Volumen in Relation der jeweils vorliegenden externen und internen Osmolalität erniedrigt.

Wenn die Osmolalität des externen Mediums mit Mischungen aus NaCl und Sorbitol eingestellt wurde, wurde deutlich mehr Glycinbetain aufgenommen, als wenn neben 50 mM NaCl im Basispuffer nur Sorbitol im externen Medium eingesetzt wurde (Abbildung 19). Um zu überprüfen, inwiefern die GB-Aufnahmerate von der internen K⁺-Konzentration abhängig ist, wurde der cytoplasmatische K⁺-Gehalt pro mg Zelltrockengewicht gemessen. Für die Berechnung der internen K⁺-Konzentration muss jedoch das cytoplasmatische Zellvolumen pro mg Zelltrockengewicht bekannt sein; um zu zeigen, zwischen welchen Extremen das cytoplasmatische Zellvolumen liegt, wurde davon ausgegangen, dass sich dieses nach einem angelegten hyperosmolalen Schock zum einen nicht erniedrigt und zum anderen in dem Verhältnis der Osmolalität der beiden verwendeten Puffer erniedrigt. Da das cytoplasmatische

Volumen zwischen diesen beiden Extremen liegt, zeigen die Daten aus Abbildung 19, dass in intakten Zellen genauso wie in Proteoliposomen eine Korrelation zwischen der internen K^+ -Konzentration und der GB-Aufnahmerate besteht.

Um den vorliegenden Hinweisen nachzugehen, dass die Aktivität von BetP möglicherweise auch in intakten Zellen von der internen K^+ -Konzentration abhängig ist, sind weitere Versuche, unter anderem auch mit *C. glutamicum*-Zellen, notwendig.

3.5 Einfluss der Membranumgebung auf die Osmoregulation von BetP

3.5.1 Einfluss der Phospholipidzusammensetzung der Proteoliposomen

Neben der Bedeutung der internen K^+ -Konzentration gibt es Hinweise darauf, dass auch die Zusammensetzung der Phospholipidmembran entscheidenden Einfluss auf die Aktivität von BetP haben könnte. So zeigte sich, dass die heterologe Expression von *betP* in *E. coli* zu einer Verschiebung des Aktivitätsoptimums der Glycinbetain-Aufnahme zu einer niedrigeren externen Osmolalität führte, verglichen mit dem Aktivitätsoptimum bei einer homologen Expression von *betP* in *C. glutamicum* (Peter *et al.*, 1996; Abbildung 20B). Um diese Verschiebung zu erklären, wurden zwei Möglichkeiten diskutiert: zum einen der sehr viel

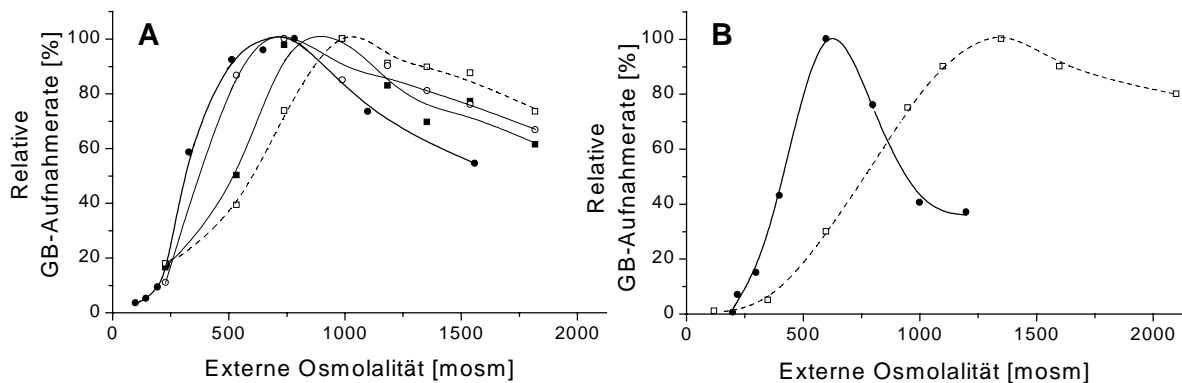


Abbildung 20: Einfluss der Phospholipidzusammensetzung auf das Osmolalitätsoptimum. (A): Die Rekonstitution wurde durchgeführt mit *E. coli*-Phospholipiden (ausgefüllte Kreise), Phosphatidylglycerin (PG, offene Quadrate) oder Mischungen aus beiden (67% *E. coli*-Lipid / 33% PG: offene Kreise; 33% *E. coli*-Lipid / 67% PG: ausgefüllte Quadrate). Die jeweils maximalen GB-Aufnahmeraten von BetP wurden auf 100% gesetzt, wobei die absoluten maximalen Aufnahmeraten wie folgt waren (Einheit: nmol GB / (min \cdot mg Protein)): *E. coli*-Lipid: 1720; 67% *E. coli*-Lipid / 33% PG: 640; 33% *E. coli*-Lipid / 67% PG: 195; PG: 156. Als interner Puffer wurde 100 mM KP_i (pH 7,5) verwendet, als externer Basispuffer 50 mM Tris/Mes (pH 7,5), 30 mM NaCl, der mit NaCl auf die entsprechenden Osmolalitätswerte eingestellt wurde. (B): Zum Vergleich sind die relativen Aufnahmeraten in intakten Zellen gezeigt (Peter *et al.*, 1996), wobei aus den Ursprungsdaten die jeweilige externe Osmolalität berechnet wurde. Ausgefüllte Kreise: *E. coli*; leere Quadrate: *C. glutamicum*.

höhere Turgordruck in Gram-positiven Bakterien verglichen mit Gram-negativen Bakterien (15-25 bzw. 1-5 atm, Poolman & Glaasker, 1998) und die unterschiedliche Phospholipid-Zusammensetzung der Plasmamembranen von *E. coli* und *C. glutamicum*. Da Proteoliposomen keinen Turgordruck aufbauen können und BetP dennoch in Proteoliposomen aktivitätsreguliert ist, ist es sehr unwahrscheinlich, dass der Turgordruck entscheidenden Einfluss auf die Aktivitätsregulation von BetP hat. Um die zweite Möglichkeit zu testen, wurden *E. coli*-Phospholipide, Phosphatidylglycerin (PG) oder Mischungen daraus zur Rekonstitution verwendet (Abbildung 20A). Die *E. coli*-Plasmamembran besteht aus 80% Phosphatidylethanolamin (PE), 15% PG und 5% Diphosphatidylglycerin (DPG, Cardiolipin) (Prasad, 1996), während die *C. glutamicum*-Plasmamembran aus 87% PG, 5% Phosphatidylinositolmannosid, 3% Phosphatidylinositol, 2,5% Phosphatidsäure und 1% DPG besteht (Hoischen & Krämer, 1990). Da es nicht gelang, stabile Liposomen aus Präparationen der *C. glutamicum*-Plasmamembran zu formen (Daten nicht gezeigt), wurden zunehmende Mengen an PG aus Hühnereigelb für die Rekonstitution verwendet, um Annäherung an die Zusammensetzung der *C. glutamicum*-Plasmamembran zu erzielen. Mit den aus unterschiedlichen Phospholipiden bestehenden Proteoliposomen wurden Glycinbetain-Aufnahmemessungen in Abhängigkeit der externen Osmolalität durchgeführt. Die Daten zeigen, dass das Aktivitätsoptimum von BetP umso weiter zu höheren Osmolalitätswerten verschoben ist, je höher der Anteil an PG in den Proteoliposomen ist (Abbildung 20A). Um diese Daten mit der physiologischen Situation in *E. coli* und *C. glutamicum* vergleichen zu können, sind die auf Osmolalitätswerte umgerechneten Daten aus Peter *et al.* (1996) in Abbildung 20B dargestellt. Die Verschiebung des Osmolalitätsoptimums in Proteoliposomen und ganzen Zellen korreliert jeweils mit der Phospholipid-Zusammensetzung der Membran. Dies deutet darauf hin, dass die Phospholipidumgebung, in der BetP eingelagert ist, starken Einfluss auf dessen Aktivitätsregulation hat.

Um die Abhängigkeit der BetP-Aktivitätsregulation von der Art des umgebenen Lipids zu erklären, gibt es zwei Möglichkeiten, die sich durch unterschiedliche Eigenschaften von PE und PG erklären lassen. Während PE, das vorwiegende Phospholipid in der *E. coli*-Plasmamembran, keine Nettoladung trägt, ist PG, das vorwiegende Phospholipid in der *C. glutamicum*-Plasmamembran, einfach negativ geladen. Außerdem ist bekannt, dass PE ohne Zusatz anderer Phospholipide keine Lipiddoppelschicht ausbilden kann (Epan, 1998), während PG dazu in der Lage ist (Seddon & Cevc, 1993). Ein geeignetes Phospholipid, das es möglich macht, beide Eigenschaften von PE und PG zu unterscheiden, ist Phosphatidylcholin

(PC), das wie PE keine Nettoladung trägt aber genauso wie PG in der Lage ist, eine Lipiddoppelschicht auszubilden. Um den Einfluss von PC auf die BetP-Aktivitätsregulation zu testen, wurde BetP in Liposomen bestehend aus 50% *E. coli*-Lipid / 50% PC rekonstituiert. Mit den resultierenden Proteoliposomen wurden GB-Aufnahmemessungen in Abhängigkeit der externen Osmolalität durchgeführt, deren Daten mit Aktivitätsraten verglichen wurden, die mit Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipid bzw. *E. coli*-Lipid / PG - Mischungen ermittelt wurden (Abbildung 21).

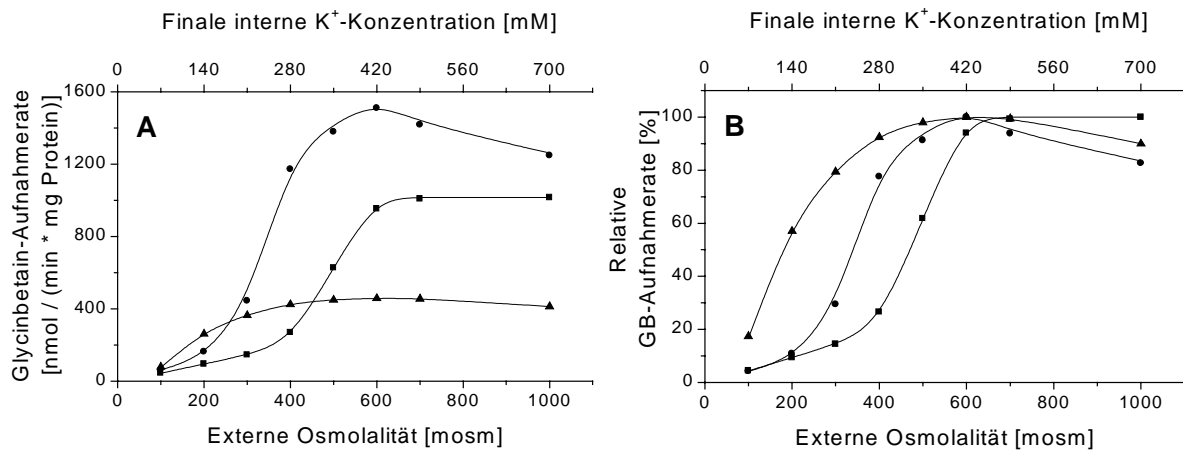


Abbildung 21: Einfluss der Lipide PC, PE und PG auf das Osmolalitätsoptimum. Die Rekonstitution von BetP wurde durchgeführt mit *E. coli*-Phospholipiden (bestehen zu 80% aus Phosphatidylethanolamin (PE), Kreise), oder Mischungen aus jeweils 50% *E. coli*-Lipid und 50% Phosphatidylcholin (PC, Dreiecke) oder 50% Phosphatidylglycerin (PG, Quadrate). Als interner Puffer wurde 100 mM KP_i (pH 7,5) verwendet, als externer Basispuffer 20 mM NaP_i (pH 7,5), 25 mM NaCl, der mit NaCl auf die entsprechenden Osmolalitätswerte eingestellt wurde. In (A) wurden die absoluten in (B) die relativen GB-Aufnahmeraten aufgetragen.

Wenn BetP in Liposomen aus reinem PC (Daten nicht gezeigt) bzw. PG (Abbildung 20A) rekonstituiert wurde, zeigten die resultierenden Proteoliposomen nur sehr geringe GB-Aufnahmeraten, weshalb Mischungen aus PC bzw. PG mit *E. coli*-Lipid für die Rekonstitution verwendet wurden. Obwohl die PC/*E. coli*-Proteoliposomen verglichen mit den *E. coli*-Proteoliposomen eine auf circa 30% reduzierte Aufnahmeaktivität zeigen, wird deutlich, dass BetP in dieser Lipidumgebung bei niedrigeren externen Osmolalitätswerten das Aktivitätsoptimum erreicht als in *E. coli*-Proteoliposomen. Dies deutet darauf hin, dass nicht das Bilayer-Verhalten der Phospholipide sondern deren negative Ladung für die Verschiebung Bereichs der externen Osmolalität, in dem die GB-Aufnahmerate anstieg, verantwortlich ist. In PC/*E. coli*-Proteoliposomen beträgt der Anteil der negativen Ladung der Phospholipide 12,5% (7,5% PG, 2,5% DPG), in *E. coli*-Proteoliposomen 25% (15% PG, 5% DPG) und in

PG/*E. coli*-Proteoliposomen 62,5% (57,5% PG, 2,5% DPG). Die negative Ladung der Phospholipide korreliert demnach mit der benötigten internen K^+ -Konzentration, die benötigt wird, um BetP zu aktivieren (Abbildung 21).

3.5.2 Einfluss von Tetracain auf die Aktivität von BetP in Proteoliposomen

Es ist bekannt, dass das Lokalanästhetikum Tetracain den physikalischen Zustand einer Membran beeinflusst und deren Membranspannung erhöht (Auger *et al.*, 1988). Versuche mit *C. glutamicum* haben gezeigt, dass die GB-Aufnahmeaktivität von BetP durch Zugabe von Tetracain erhöht wird (Peter *et al.*, 1998a). Um nachzuweisen, dass die Zugabe von Tetracain auch in Proteoliposomen zu einer Erhöhung der GB-Aufnahmerate führt, wurden unter isoosmolalen Bedingungen und Zugabe von 0 bis 1,05 mM Tetracain GB-Aufnahmemessungen durchgeführt (Abbildung 22A). Es zeigte sich, dass niedrige Konzentrationen von Tetracain zu einer Erhöhung der BetP-Aktivität führten. Das Optimum der BetP-Aktivität wurde bei einer Konzentration von 0,45 mM Tetracain erreicht und ist demnach ähnlich wie in

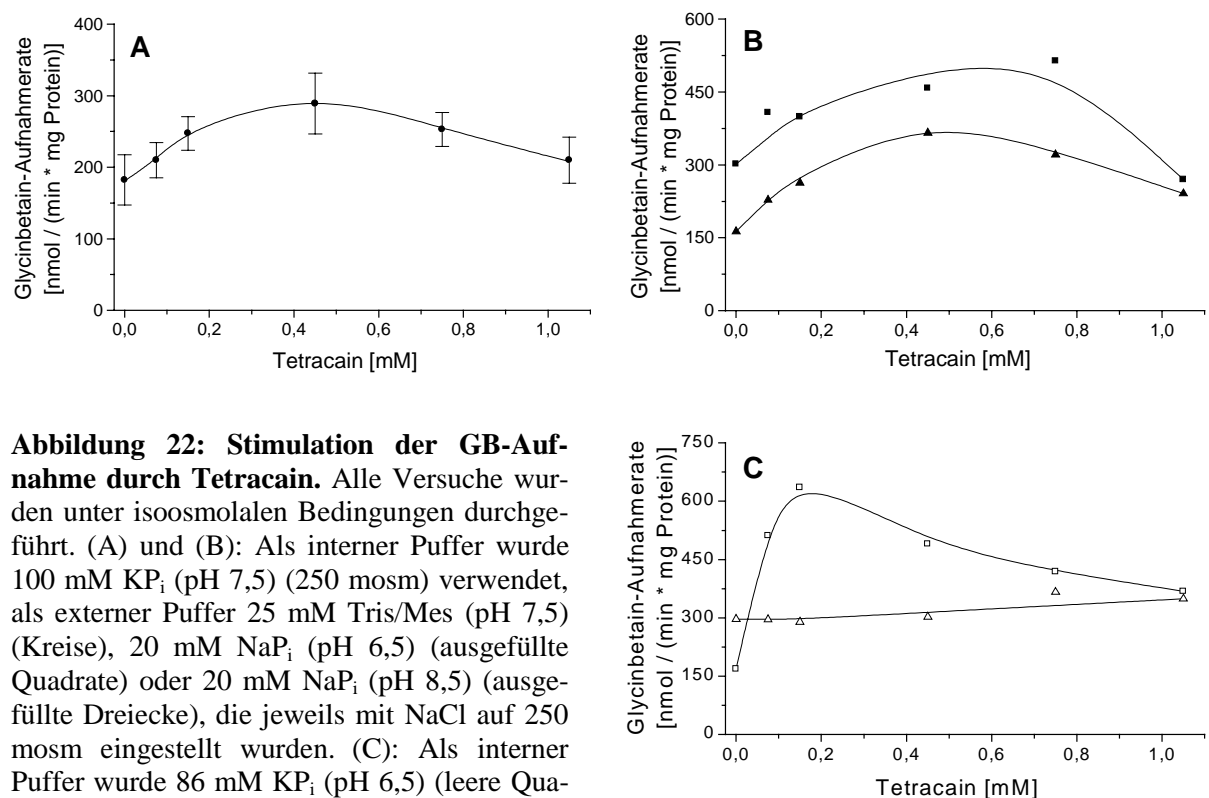


Abbildung 22: Stimulation der GB-Aufnahme durch Tetracain. Alle Versuche wurden unter isoosmolalen Bedingungen durchgeführt. (A) und (B): Als interner Puffer wurde 100 mM KP_i (pH 7,5) (250 mosm) verwendet, als externer Puffer 25 mM Tris/Mes (pH 7,5) (Kreise), 20 mM NaP_i (pH 6,5) (ausgefüllte Quadrate) oder 20 mM NaP_i (pH 8,5) (ausgefüllte Dreiecke), die jeweils mit NaCl auf 250 mosm eingestellt wurden. (C): Als interner Puffer wurde 86 mM KP_i (pH 6,5) (leere Quadrate) oder 72 mM KP_i (pH 8,5) (leere Dreiecke) (jeweils 200 mosm) verwendet, als externer Puffer 20 mM NaP_i , 75 mM NaCl (200 mosm). Abweichend von der Regel wurden die Werte für die Datenpunkte in B und C nur in einer Einfachbestimmung ermittelt.

C. glutamicum-Zellen (0,5 bis 0,75 mM Tetracain, Peter *et al.*, 1998a). Eingebettet in eine Phospholipidmembran liegt der pK-Wert von Tetracain bei 7,5 (Schreier *et al.*, 1984), so dass aufgrund des verwendeten pH-Wertes von 7,5 sowohl die positiv geladene als auch die ungeladene Form Tetracains für die Aktivitätssteigerung verantwortlich sein konnte. Deshalb wurden die Versuche sowohl bei pH 6,5 als auch bei pH 8,5 durchgeführt, wobei Tetracain bei pH 6,5 überwiegend positiv geladen und bei pH 8,5 vorwiegend ungeladen vorliegt. Um zu überprüfen, ob eine Änderung des pH-Wertes einen Einfluss auf die Aktivität von BetP hat, wurde der externe bzw. interne Puffer auf pH 6,5 oder 8,5 eingestellt und die GB-Aufnahmerate gemessen. Dabei wurde davon ausgegangen, dass innerhalb des Messzeitraums von zehn Sekunden kein wesentlicher Ausgleich des internen und externen pH-Wertes stattfand.

Eine Änderung des pH-Wertes des externen Mediums sowohl auf pH 6,5 als auch auf pH 8,5 führte zu einer ähnlichen Abhängigkeit der GB-Aufnahmerate vom zugegebenen Tetracain wie bei pH 7,5 (Abbildung 22B im Vergleich zu A). Eine Erhöhung des pH-Wertes des internen Mediums auf pH 8,5 führte dazu, dass sich die GB-Aufnahmerate durch Zugabe von Tetracain nicht erhöhte, während eine Erniedrigung des pH-Wertes auf pH 6,5 dazu führte, dass bereits bei einer Konzentration von 0,15 mM Tetracain das Maximum der GB-Aufnahmerate erreicht wurde (Abbildung 22C im Vergleich zu A). Bei einem internen pH-Wert von 6,5 führte eine Zugabe von 0,075 mM Tetracain zu einer Erhöhung der GB-Aufnahmerate um den Faktor 3,0, während bei pH 7,5 die sechsfache Tetracainkonzentration eingesetzt werden musste, um die GB-Aufnahmerate um den Faktor 1,6 zu erhöhen (Abbildung 22C im Vergleich zu A). Dies korreliert mit der Tatsache, dass bei pH 6,5 zehnmal soviel positiv geladenes Tetracain vorliegt wie bei pH 7,5. Folglich wirkt Tetracain vermutlich nur auf der internen Seite der Membran und zwar nur in der positiv geladenen Form.

3.6 Orientierung von Strep-BetP in Zellen und Proteoliposomen

3.6.1 Orientierung von Strep-BetP in *E. coli*-Zellen

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die terminalen Domänen von BetP für dessen Osmoregulation von großer Bedeutung sind, da Verkürzungen der N- bzw. C-terminalen Domäne zu Veränderungen in der Osmostresswahrnehmung führten bzw. zu einer Glycinbetainaufnahme, die von hyperosmotischen Stressbedingungen unabhängig war (Peter *et al.*, 1998a). Zur gezielteren Untersuchung dieser Effekte und zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung der C- und N-terminalen Extensionen bei der Wahrnehmung der internen K^+ -Konzentration war es notwendig, die Lokalisation der Extensionen, die bisher nur aufgrund eines computergestützten Topologiemodells vorgeschlagen wurde, experimentell zu überprüfen.

3.6.1.1 Bestimmung der Lokalisation der Extensionen von BetP durch ELISA

Mit Hilfe einer ELISA-Technik wurde untersucht, ob der N- bzw. C-Terminus von BetP eher in invertierten Membranvesikeln oder eher in Sphäroplasten für das Streptavidin-AP-Konjugat zugänglich ist. Hierdurch wurde überprüft, ob die terminalen Bereiche von BetP auf der internen oder externen Seite der Membran liegen. Die Grundlage dieser Technik ist der immunologische Nachweis des Strep-tagII, der entweder am N- oder C-Terminus von BetP fusioniert war. Dazu wurden die Stämme DH5 α *mcr* pASK-IBA5-*betP* (N-terminaler Strep-tagII) bzw. DH5 α *mcr* pASK-IBA3-*betP* (C-terminaler Strep-tagII) verwendet. Inwiefern sich die GB-Aufnahmeaktivitäten der beiden Fusionsproteine voneinander unterschieden, wurde im Stammhintergrund MKH13 gezeigt, da dieser Stamm aufgrund der Deletionen weiterer Aufnahmesysteme für kompatible Solute für die notwendigen GB-Aufnahmemessungen geeignet war (3.7.1).

Es wurde gezeigt, dass die immunologische Reaktion des Streptavidin-AP-Konjugats mit dem am N- oder C-Terminus von BetP fusionierten Strep-tagII in invertierten Membranvesikeln stärker war als in Sphäroplasten (Abbildung 23). Die schwächere Immunreaktion in Sphäroplasten läßt darauf schließen, dass die terminalen Domänen von BetP in intakten Zellen zum Cytoplasma gerichtet sind und erst durch die Vesikelpräparation für das Konjugat zugänglich wurden. Um auszuschließen, dass die Vesikelpräparation an sich zu der verstärkten Immunreaktion führte, wurde zur Kontrolle der *betP*-freie Stamm DH5 α *mcr*

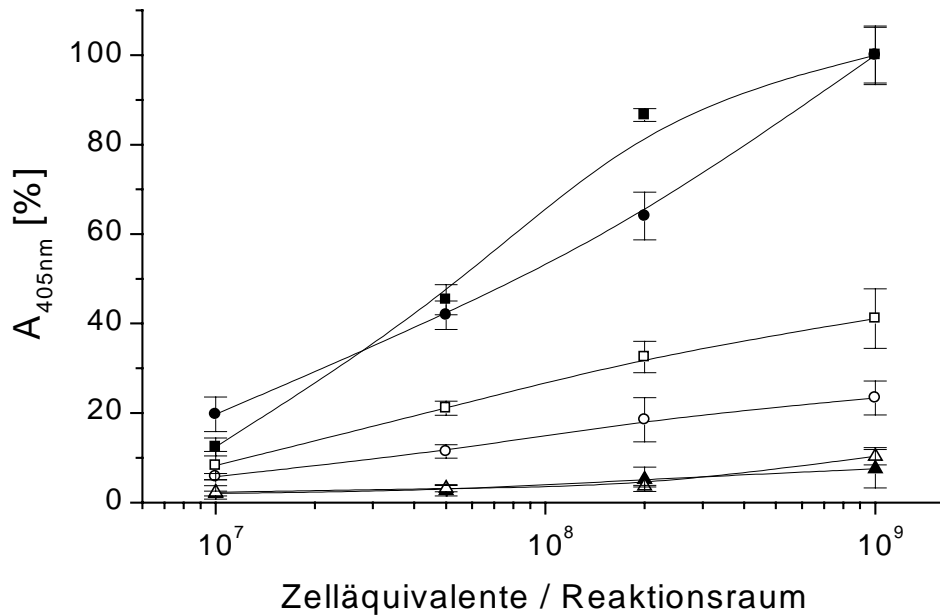


Abbildung 23: Bestimmung der Lokalisation der Extensionen von BetP durch ELISA. Aus induzierten Zellen der Stämme DH5 α mcr pASK-IBA5-*betP* (Kreise, N-terminaler Strep-tagII), DH5 α mcr pASK-IBA3-*betP* (Quadrate, C-terminaler Strep-tagII) und DH5 α mcr pASK-IBA5 (Dreiecke) wurden Sphäroplasten (leere Symbole) bzw. invertierte Membranvesikel (ausgefüllte Symbole) präpariert. Die jeweils höchste Absorption der BetP-exprimierenden Stämme wurde auf 100% gesetzt. Zum immunologischen Nachweis wurde Streptavidin-AP-Konjugat verwendet, das spezifisch Strep-tagII bindet.

pASK-IBA5 verwendet (Abbildung 23). Der Nachweis der internen Lage der terminalen Domänen von BetP bestätigt das vorliegende computergestützte Topologiemodell.

Sphäroplasten, die aus Zellen des Stammes DH5 α mcr pASK-IBA3-*betP* präpariert wurden, zeigten eine stärkere Immunreaktion als Sphäroplasten, die aus Zellen des Stammes DH5 α mcr pASK-IBA5-*betP* präpariert wurden (Abbildung 23). Dies ist dadurch zu erklären, dass die Wachstumskurve des Stammes DH5 α mcr pASK-IBA3-*betP* schon kurz nach der Induktion abknickte, weshalb die Zellen schon 40 Minuten nach der Induktion geerntet wurden. Das Abknicken der Wachstumskurve ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der Einbau des BetP-Proteins mit C-terminalem Strep-tagII in die Membran toxisch auf die Zelle wirkte, da beobachtet werden konnte, dass die Zellen nach der Induktion vermehrt lysierten. Wahrscheinlich konnte das Streptavidin-AP-Konjugat aufgrund der Schädigungen der Zellmembran, die durch die Toxizität des Genprodukts verursacht wurden, teilweise auch in Sphäroplasten den intern orientierten Strep-tagII von BetP binden. Zusammenfassend bestätigen alle Daten dieses Versuches das vorliegende Topologiemodell von BetP.

3.6.1.2 Konstruktion der Gene des cysteinfreien BetP-Proteins und der „Einzelcystein-BetP-Proteine“

Um Topologieuntersuchungen mit „Einzelcystein-BetP-Proteinen“ durchführen zu können (3.6.1.3), war es zunächst notwendig, ein cysteinfreies BetP-Protein herzustellen, das als Grundlage für spätere gerichtete Einführungen von Cysteinresten diente. Dazu wurde mittels ortsgerichteter Mutagenese das einzige Codon im *strepbetP*-Gen, das für Cystein kodiert, gegen ein Codon ausgetauscht, das für Threonin codiert. Threonin wurde gewählt, da in mit BetP verwandten Proteinen an der entsprechenden Position ein Threoninrest liegt (Abbildung 24 und Anhang 3). Für die Klonierungsarbeiten wurde der Vektor pASK-IBA5-*betP* verwendet; der Vektor, der *cys-less-betP* exprimiert, wurde pAc11 genannt. Das Syntheseprodukt von *cys-less-betP* ist ein cysteinfreies BetP-Protein, wobei das Gen als Grundlage für die Konstruktion der Gene der „Einzelcystein-BetP-Proteine“ verwendet wurde. Diese Gene wurden ebenfalls mittels ortsgerichteter Mutagenese konstruiert, wobei bei der Bezeichnung des Aminosäure-Austausches der Angabe der substituierten AS dessen Position im Protein und die Bezeichnung der neu eingebauten AS folgt (Tabelle 3 und Abbildung 24). Die Auswahl der auszutauschenden Aminosäurereste richtete sich danach, ob diese in einer Extension bzw. hydrophilen Schleife positioniert waren, wobei auch einige konservierte Reste

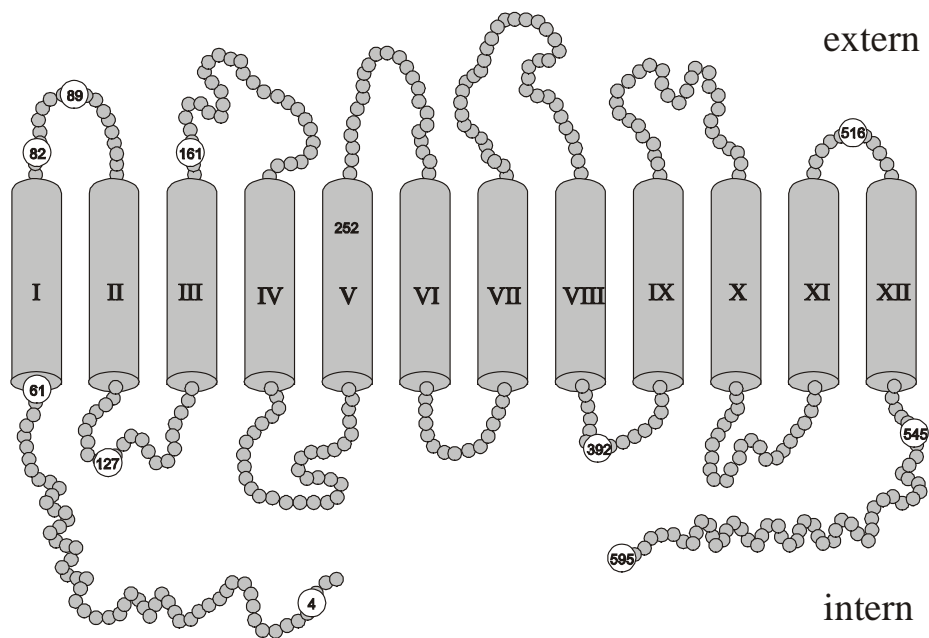


Abbildung 24: Zusammenfassung der gegen Cystein ausgetauschten Aminosäurereste auf Grundlage des cysteinfreien BetP. Um ein BetP-Protein zu erhalten, das keinen Cysteinrest enthält, wurde der einzige im Wildtyp-BetP-Protein vorliegende Cysteinrest (C252) gegen Threonin ausgetauscht. Die Positionen, an denen in das cysteinfreie BetP jeweils ein Cysteinrest eingebaut wurde, sind mit einem Kreis markiert.

Tabelle 6: Orientierung von Strep-BetP in *E. coli*-Zellen. Die Positionen der gegen Cystein ausgetauschten AS-Reste sind in Abbildung 24 dargestellt. Die im Topologiemodell extern liegenden AS-Reste sind grau unterlegt.

DH5 α <i>mcr</i> pAc11 ...	S4C	S89C	S516C	R595C
Zugänglichkeit für SM ¹ in ganzen Zellen	—	+ ²	+ ²	—
Zugänglichkeit für SM in invertierten Membranvesikeln	—	n.g.	n.g.	—

¹ nicht membrangängig; ² siehe Abbildung 25; — : nicht zugänglich; + : zugänglich; n.g.: nicht getestet.

(Anhang 4) ausgetauscht wurden. GB-Aufnahmemessungen zur Untersuchung eventueller Einbußen der Aktivität der „Einzelcystein-BetP-Proteine“ wurden im Stammhintergrund MKH13 durchgeführt (3.7.2).

3.6.1.3 Bestimmung der Lokalisation der ersten und letzten Schleife von BetP

Um die zuvor beschriebenen Daten zur Orientierung von BetP in der Cytoplasmamembran (3.6.1.1) zu bestätigen, wurde mit Hilfe von thiol-spezifischen Reagenzien nachgewiesen, dass die laut Topologiemodell erste und letzte Schleife des Proteins zur externen Seite der Membran gerichtet sind (Abbildung 24 und Tabelle 6). Die Grundidee des Nachweises ist, dass das membran-impermeable Reagenz 4-Acetamino-4'-maleimidylstilben-2,2'-disulfonat (SM) zwar an die extern gelegenen aber nicht an die intern gelegenen Cysteinreste bindet. Eine nachfolgende Inkubation mit dem membran-permeablen Reagenz 3-(N-Maleimidylpropionyl)-Biocytin (BM), das immunologisch mit dem Avidin-AP-Konjugat nachgewiesen werden kann, bindet nur an Cysteinreste, an die zuvor nicht SM gebunden hat.

Mit Hilfe dieser Methode konnte nachgewiesen werden, dass die AS-Reste S89 und S516 auf der externen Seite der Membran liegen, womit das vorliegende Topologiemodell bestätigt wird (Abbildung 25). Die intern liegenden AS-Reste S4C und R595C waren zwar wie erwartet nicht für SM zugänglich, jedoch waren diese Reste auch in invertierten Membranvesikeln nicht für SM zugänglich, weshalb keine Aussage zur Lokalisation dieser beiden Reste gemacht werden kann (Tabelle 6). Die prinzipielle Nichtzugänglichkeit von S4C und R595C könnte dadurch erklärt werden, dass die terminalen Bereiche der Extensionen eventuell so gefaltet sind, dass beide AS-Reste nicht von SM gebunden werden können.

Zusammenfassend wurde mit Hilfe zweier unterschiedlicher Methoden die Orientierung von BetP, die sich aus dem vorliegenden Topologiemodell ergibt, bestätigt und nachgewiesen.

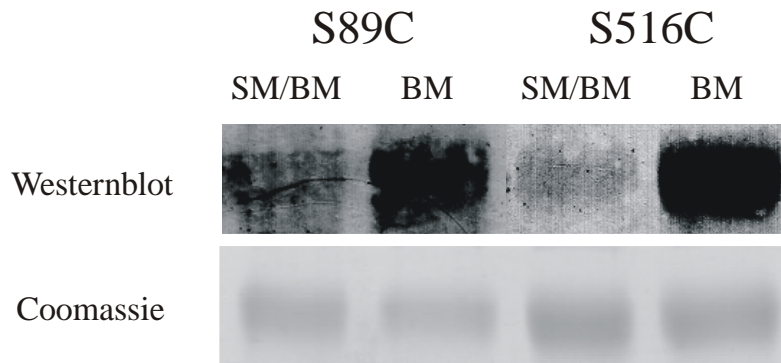


Abbildung 25: Nachweis der externen Lokalisation der Aminosäurereste S89 und S516. Die AS-Reste S89 und S516 wurden gegen Cystein ausgetauscht und in *E. coli*-Zellen mit 400 μ M SM für 30 min inkubiert. Nach erfolgter Proteinreinigung wurden die Proteine mit 200 μ M BM für 30 min inkubiert und dessen Bindung im Westernblot durch Avidin-AP-Konjugat nachgewiesen. Der Auftrag gleicher Mengen BetP-Protein wurde durch eine Coomassie-Färbung nachgewiesen.

3.6.2 Orientierung von Strep-BetP in Proteoliposomen

Um Aussagen über funktionelle Bereiche im BetP-Protein, die für die Osmostresswahrnehmung und -regulation wichtig sind, machen zu können, ist es notwendig, die Orientierung von BetP in den untersuchten Proteoliposomen zu bestimmen. Die Ergebnisse der beiden im folgenden beschriebenen Methoden waren jedoch nicht aussagekräftig genug, um diese Frage eindeutig zu klären.

3.6.2.1 Bestimmung der Zugänglichkeit der „Einzelsystein-BetP-Proteine“ für thiol-spezifische Reagenzien

Ähnlich wie in Zellen sollte auch für Proteoliposomen der Nachweis der Orientierung von Strep-BetP in der Membran mit thiol-spezifischen Reagenzien erfolgen. Dazu wurden „Einzelsystein-BetP-Proteine“ in *E. coli*-Liposomen rekonstituiert, für 3-30 Minuten mit 100-400 μ M SM und anschließend für 30 Minuten mit 200 μ M BM inkubiert, wobei der Nachweis der Reaktion von BM mit dem Cysteinrest immunologisch mit Hilfe des Avidin-AP-Konjugats erfolgte. Unabhängig von der Inkubationszeit und -konzentration von SM waren alle Cysteinreste, die für BM zugänglich waren auch für SM zugänglich (Tabelle 7). Dadurch lässt sich keine Aussage über die Orientierung von BetP in Proteoliposomen machen.

Tabelle 7: Zugänglichkeitsuntersuchungen in Proteoliposomen. Die Positionen der gegen Cystein ausgetauschten AS-Reste sind in Abbildung 24 dargestellt. Die im Topologiemodell extern liegenden AS-Reste sind hellgrau unterlegt. Widersprüchliche Daten zur Orientierung von BetP in Proteoliposomen sind dunkelgrau unterlegt.

	Cys-frei	S4C	S61C	S89C	L127C	S516C	S545C	R595C
Zugänglichkeit für SM ¹ in Proteoliposomen	n.t.	+	n.t.	+	+	+	n.t.	+
Zugänglichkeit für BM ² in Proteoliposomen	-	(+)	-	+	+	+	-	(+)

¹nicht membrangängig; ² membrangängig; - : nicht zugänglich; + : zugänglich;
 (+) : schwach zugänglich; n.t.: nicht testbar, da der AS-Rest nicht für BM zugänglich ist.

3.6.2.2 Untersuchung der Orientierung von Strep-BetP durch ELISA

Da die Orientierung von Strep-BetP in Zellen als gesichert anzusehen ist, wäre es zur Bestimmung der Orientierung von Strep-BetP in Proteoliposomen ausreichend zu untersuchen, ob der N-Terminus von Strep-BetP auf der internen oder externen Seite der Phospholipidmembran liegt. Da Strep-tagII N-terminal an BetP fusioniert ist, kann die Reaktion von Strep-tagII mit Streptavidin-AP-Konjugat im ELISA für die Bestimmung der Lage des N-Terminus ausgenutzt werden. Um eventuell im Inneren der Proteoliposomen liegende N-Termini ebenfalls für die Reaktion mit dem Streptavidin-AP-Konjugat zugänglich zu machen, wurden die Proteoliposomen mit Triton X-100 teilweise oder vollständig solubilisiert und mit der Zugänglichkeit nicht solubilisierter Proteoliposomen verglichen (Abbildung 26).

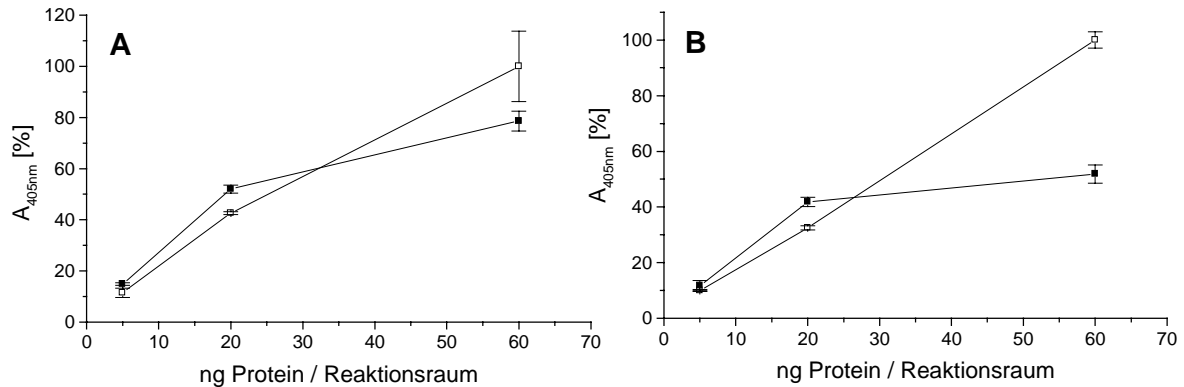


Abbildung 26: Untersuchung der Orientierung von Strep-BetP in Proteoliposomen durch ELISA. Ausgefüllte Quadrate: Proteoliposomen (LPR 30:1) wurden mit 1 µl (A) bzw. 3 µl (B) Triton X-100 / mg Lipid zu 15% (A) bzw. 100% (B) solubilisiert (vergl. Abbildung 6). Leere Quadrate: Proteoliposomen wurden nicht mit Triton X-100 behandelt. Die höchste Absorption wurde jeweils auf 100% gesetzt. Zur Bindung des Strep-tagII wurde das Streptavidin-AP-Konjugat verwendet.

Das Ergebnis der Untersuchungen ist nicht eindeutig, da es von der eingesetzten Proteoliposomenkonzentration abhängig ist. Bei einer Proteinnmenge von 5 bis 20 ng / Reaktionsraum sind die solubilisierten Proteoliposomen ein wenig besser für das Streptavidin-AP-Konjugat zugänglich als die nicht solubilisierten Proteoliposomen. Dies würde dafür sprechen, dass zumindest ein Teil der Strep-BetP-Proteine in der gleichen Orientierung wie in Zellen eingebaut ist. Bei einer höheren Proteoliposomenkonzentration reagieren die solubilisierten Proteoliposomen jedoch schlechter mit dem Streptavidin-AP-Konjugat als die nicht solubilisierten. Dies könnte auf eine mögliche Schädigung des Konjugats durch das zugesetzte Detergenz Triton X-100 zurückgeführt werden.

Zusammenfassend ist die gewählte Methode genauso wie die zuvor beschriebene nicht geeignet, die Orientierung von Strep-BetP in Proteoliposomen zu bestimmen, weshalb zur Klärung dieser Frage in Zukunft andere Methoden gewählt werden müssen.

3.7 Kinetische Eigenschaften von verschiedenen MKH13-Stämmen

Zur besseren Übersichtlichkeit sind alle Daten der MKH13-Stämme, die rekombinante Proteine synthetisieren, in diesem Abschnitt zusammengefasst, wobei von allen in dieser Arbeit beschriebenen rekombinanten Proteinen die Transportaktivitäten gemessen und mit der des Wildtyp-BetP-Proteins verglichen wurden, da jede eingeführte Mutation Einfluss auf die Transportaktivität oder die Einbaurrate des Proteins in die Membran haben kann. Dabei wurde als Stammhintergrund jeweils *E. coli* MKH13 verwendet, da in diesem Stamm die Gene für alle Transportsysteme für kompatible Solute (PutP, ProP und ProU) deletiert sind.

3.7.1 Einfluss eines N- bzw. C-terminalen Strep-tagII

Es wurde gezeigt, dass ein N-terminaler Strep-tagII keinen Einfluss auf die Transportaktivität und Osmoregulation von BetP hat (Morbach, persönliche Mitteilung). Für die Bestimmung der Lokalisation der C-terminalen Domänen von BetP in intakten Zellen (3.6.1.1) wurde auch C-terminal ein Strep-tagII an BetP fusioniert. Diese Fusion hatte erheblichen Einfluss auf die

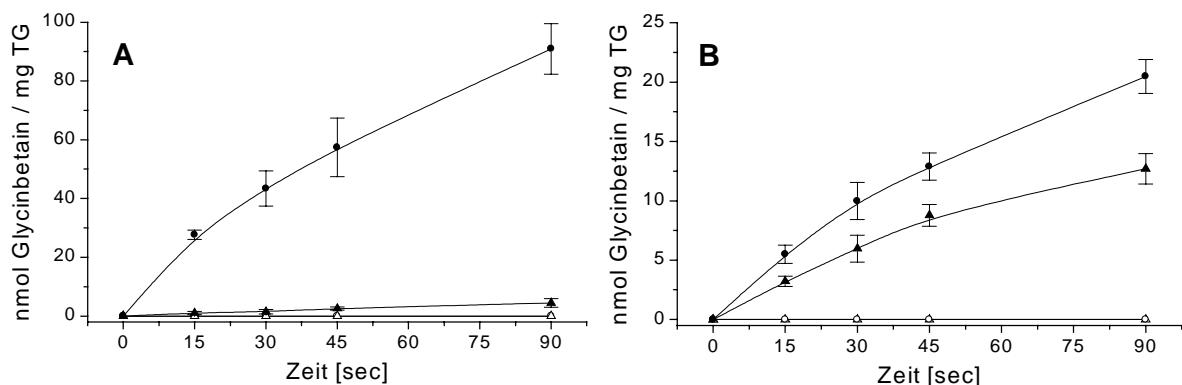
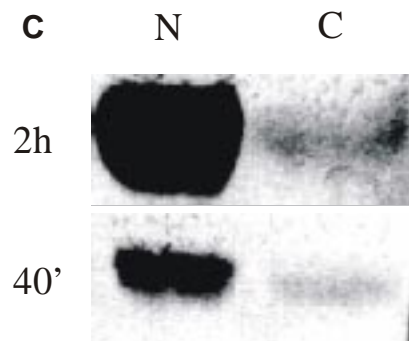


Abbildung 27: Glycinbetainaufnahme in MKH13-Stämmen. Die Zellen wurden 2 h (A und C) bzw. 40 min (B und C) mit AHT induziert. (A)/(B): Aufgetragen ist die GB-Aufnahme von MKH13 pASK-IBA5-*betP* (ausgefüllte Kreise, BetP mit N-terminalem Strep-tagII), MKH13 pASK-IBA3-*betP* (ausgefüllte Dreiecke, BetP mit C-terminalem Strep-tagII), MKH13 pASK-IBA5 (leere Kreise, keine BetP-Synthese) und MKH13 pASK-IBA3 (leere Dreiecke, keine BetP-Synthese). (C): Der BetP-Einbau in die Membran wurde im Westernblot nachgewiesen. Zum immunologischen Nachweis wurde Streptavidin-AP-Konjugat verwendet. Strep-tagII wurde N-terminal (N) bzw. C-terminal (C) an BetP fusioniert.



Höhe der GB-Aufnahmerate (Abbildung 27A). Der immunologische Nachweis mit Streptavidin-AP-Konjugat zeigte, dass die geringere Transportaktivität im Vergleich mit BetP, das N-terminal mit Strep-tagII fusioniert ist, auf einen erheblich geringeren Einbau des Proteins in die Membran zurückzuführen ist (Abbildung 27C). Wenn BetP mit einem C-terminalen Strep-tagII in der Zelle synthetisiert wird, erfolgt möglicherweise ein inkorrekt Einbau des Proteins in die Cytoplasmamembran, wodurch das Protein toxisch auf die Zelle wirkt. Durch eine Verkürzung der Induktionszeit auf ein Drittel konnte die geringe Transportaktivität des Proteins erhöht werden, wodurch wahrscheinlich weniger Zellen lysiert wurden, so dass mehr intakte Zellen Glycinbetain aufnehmen konnten (Abbildung 27B).

3.7.2 GB-Aufnahmeraten von „Einzelsystein-Mutanten“

Die gemessenen Transportraten der Stämme, die „Einzelsystein-BetP-Proteine“ synthetisieren, sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Der Austausch C252T, der zu einem cysteinfreien BetP-Protein führte, hatte keinen Einfluss auf die Transportrate. Fast alle Stämme, die „Einzelsystein-BetP-Proteine“ synthetisierten, zeigten genauso oder fast genauso hohe Transportaktivitätsraten wie das Wildtyp-BetP-Protein. Der Austausch R392C bewirkte, dass keine Transportaktivität mehr gemessen werden konnte, da nur sehr geringe Mengen des rekombinanten Proteins in die Cytoplasmamembran eingebaut wurden. Eventuell ist der hochkonservierte Aminosäurerest R392 essentiell für den Einbau des Proteins in die Membran.

Tabelle 8: Transportraten von MKH13-Stämmen. Die Transportrate von MKH13 pASK-IBA5-*betP* wurde auf 100% gesetzt und mit den Transportraten der Stämme verglichen, die das cysteinfreie BetP-Protein bzw. „Einzelsystein-BetP-Proteine“ synthetisieren. Die Positionen der gegen Cystein ausgetauschten AS-Reste sind in Abbildung 24 dargestellt. Die im Topologiemodell extern liegenden AS-Reste sind hellgrau unterlegt. Abweichend von der Regel wurden die Transportraten teilweise nur in einer Einfachbestimmung ermittelt.

MKH13 pAcl1 ...	Cys-frei	S4C	S61C	D82C	S89C	L127C	E161C	R392C	S516C	S545C	R595C
Transportaktivitätsrate in %	100	100	100	100	40	100	70	0*	100	90	80

* nur sehr geringer Einbau des Proteins in die Membran

3.7.3 Einfluss von Verkürzungen des C-Terminus auf die GB-Aufnahme

Da der C-Terminus von BetP entscheidenden Einfluss auf dessen Osmoregulation hat (Peter *et al.*, 1998a), wurden die BetP-Proteine mit verkürzten C-Extensionen, die in der Arbeit von Peter *et al.* verwendet wurden, mit Strep-tagII fusioniert. Dadurch war es nun möglich, diese Proteine zu reinigen und zu rekonstituieren. Die Nummerierung der C-Deletionen orientiert sich an der Nomenklatur, die in der oben erwähnten Arbeit verwendet wurde. Obwohl die rekombinanten Proteine im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr gereinigt und rekonstituiert wurden, wurden immunologische und kinetische Untersuchungen mit den Stämmen durchgeführt, um die molekulargenetischen Arbeiten zu dokumentieren und die Ausgangsposition für die wichtigen weitergehenden Arbeiten mit diesen Proteinen darzulegen. Die Daten zeigen, dass in allen Stämmen die rekombinanten Proteine in die Cytoplasmamembran eingebaut wurden (Abbildung 28B). Damit wurde gezeigt, dass diese Proteine für eine Proteinreinigung und Rekonstitution verwendet werden können. Darüberhinaus wurde gezeigt, dass in dem verwendeten Stamm eine Verkürzung um 12 oder 23 AS am C-Terminus von BetP kaum Einfluss auf die Transportaktivität hatte. Eine Verkürzung um 52 AS führte jedoch verglichen mit MKH13 pAc11 zu einem Rückgang der Transportrate auf $2,0\% \pm 0,3\%$ (Abbildung 28A).

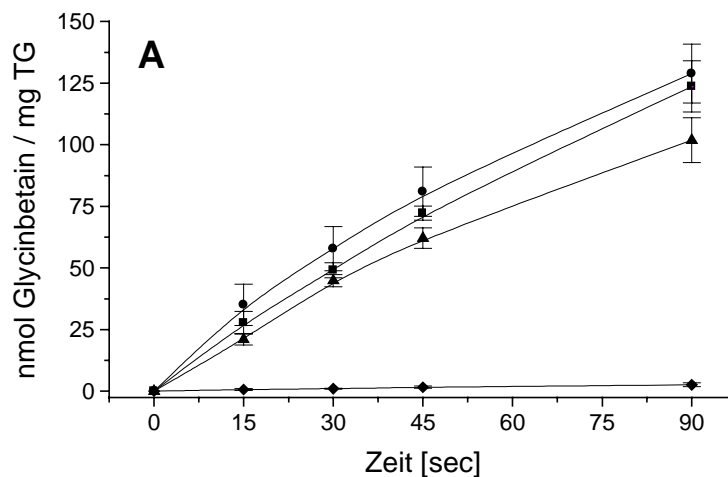
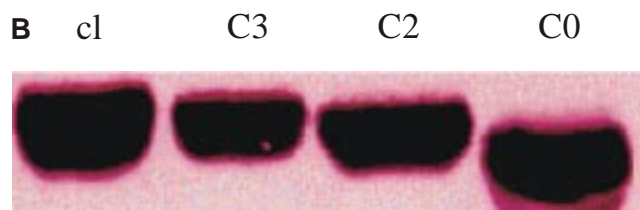


Abbildung 28: Einfluss von Deletionen am C-Terminus auf die GB-Aufnahme.

Es wurden Transportmessungen durchgeführt (A) und der BetP-Einbau in die Membran im Westernblot nachgewiesen (B). Kreise, cl: MKH13 pAc11 (Synthese von cysteinfreiem BetP), Quadrate, C3:

MKH13 pAc11 C3-Del. (12 AS am C-Terminus fehlen), Dreiecke, C2: MKH13 pAc11 C2-Del. (23 AS am C-Terminus fehlen), Rauten, C0: MKH13 pAc11 C0-Del. (52 AS am C-Terminus fehlen).



4 Diskussion

Unter hyperosmotischen Bedingungen schützen sich Zellen vor einem Wasserverlust, indem sie osmoprotektive Substanzen akkumulieren. Es sind eine Reihe von Membranproteinen bekannt, die aufgrund eines hyperosmotischen Reizes entweder kompatible Solute aufnehmen oder die Information an cytoplasmatische Proteine weitergeben. Trotz intensiver Untersuchungen ist bisher nicht bekannt, welchen Reiz ein osmoreguliertes Membranprotein unter hyperosmotischen Bedingungen wahrnimmt, der letztendlich zur Aktivierung führt. Um diese Frage zu klären, wurde in der vorliegenden Arbeit der Na⁺/Glycinbetain-Transporter BetP aus *C. glutamicum* sowohl in Proteoliposomen als auch in Zellen untersucht.

4.1 Charakterisierung von BetP in Proteoliposomen

Die Charakterisierung von BetP in Proteoliposomen war notwendig, um 1.) zu untersuchen, ob die osmostressabhängige Aktivierung von BetP abhängig oder unabhängig von Wechselwirkungen mit anderen Proteinen oder Cofaktoren ist, 2.) die Eigenschaften des Proteins in Proteoliposomen mit denen in ganzen Zellen zu vergleichen und 3.) Eigenschaften von BetP zu untersuchen, die in intakten Zellen nur schwierig oder gar nicht zu untersuchen sind. Voraussetzung hierfür sind größere Mengen an isoliertem, gereinigtem und funktionell aktivem Protein, sowie die Optimierung der Rekonstitutionsmethode und der Bedingungen während einer Glycinbetain-Aufnahmemessung.

Die plasmidvermittelte Expression von *betP* unter der Kontrolle eines Tetracyclinpromotors in *E. coli* und die anschließende Reinigung des Genprodukts über eine StrepTactin-Affinitätschromatographie führte zu einer Proteinausbeute von circa 600 µg isoliertem Strep-BetP aus einem Liter Zellkultur. Dies ist eine für Membranproteine relativ hohe Proteinausbeute. Die Identität von Strep-BetP wurde immunologisch bestätigt und die sehr hohe Reinheit des isolierten Proteins wurde mit Hilfe einer Silberfärbung nachgewiesen. Es folgte die Rekonstitution von funktionell aktivem Strep-BetP in *E. coli*-Phospholipid-Liposomen, wobei mit den resultierenden Proteoliposomen zunächst nur sehr niedrige GB-Aufnahmeraten gemessen wurden. Höhere GB-Aufnahmeraten wurden durch Variationen verschiedener Parameter während der Proteinreinigung und Rekonstitution erzielt.

Um zu überprüfen, ob BetP in Proteoliposomen voll funktionsfähig ist oder ob es dafür mit anderen Proteinen oder Cofaktoren wechselwirken muss, ist es sinnvoll, die K_M -Werte von

BetP in Proteoliposomen zu bestimmen und mit denen aus intakten Zellen (Peter *et al.*, 1996) zu vergleichen. Die nur geringen Abweichungen der K_M -Werte für Glycinbetain und Na^+ in den beiden Systemen sowie der sehr hohe V_{\max} -Wert für Glycinbetain in Proteoliposomen sind ein sehr guter Hinweis darauf, dass die Rekonstitution von BetP in Liposomen zu keiner Beeinträchtigung der Funktion von BetP führt.

Das rekonstituierte System macht es möglich, die Abhängigkeit der Glycinbetainaufnahme vom elektrochemischen Na^+ -Potenzial, die in *C. glutamicum*-Zellen bereits nachgewiesen wurde (Farwick *et al.*, 1995), exakter zu erfassen und die Abhängigkeit vom chemischen bzw. elektrischen Potenzial getrennt voneinander zu betrachten. BetP zeigte wie erwartet eine lineare Abhängigkeit vom chemischen Na^+ -Potenzial und eine sigmoide Abhängigkeit vom elektrischen Potenzial wie sie für sekundäre Transporter typisch ist. Steht BetP ein elektrochemisches Potenzial zur Verfügung multiplizieren sich die Einflüsse des chemischen Na^+ -Potenzials und elektrischen Potenzials, wodurch eine sehr viel höhere GB-Aufnahmerate zu beobachten ist, als wenn nur eines der beiden Potenziale angelegt ist (Abbildung 9).

Die anfängliche Substrataufnahmerate von BetP in Proteoliposomen ist schnell und unmittelbar. Durch eine Extrapolation der Werte für die Glycinbetainaufnahme nach fünf und zehn Sekunden kann abgeschätzt werden, dass die Aktivierung von BetP innerhalb einer Sekunde stattfindet (Peter *et al.*, 1998b). Diese Beobachtung wurde auch dadurch bestätigt, dass 'solid supported membrane'-Untersuchungen (Seifert *et al.*, 1993) Hinweise darauf lieferten, dass die Aktivierung von BetP innerhalb von weniger als 60 Millisekunden nach Anlegen eines hyperosmotischen Schocks erfolgte (Burger, persönliche Mitteilung). Diese Ergebnisse zeigen, dass BetP eine unmittelbare Folge des hyperosmotischen Stresses wahrnimmt und dass die Reizübermittlung zum katalytischen Zentrum des Proteins sehr schnell erfolgt. Im Vergleich dazu erfolgt die osmoregulatorische Antwort des Na^+ /Ectoin/Glycinbetain/Prolin-Transporters EctP aus *C. glutamicum* erst mit einer Verzögerung von einigen Sekunden (Peter *et al.*, 1998b). Dies spricht für eine unterschiedliche Osmostresswahrnehmung bzw. Osmoregulation der beiden Transporter.

Ein im Vorfeld nicht unbedingt zu erwartendes Ergebnis war, dass BetP in Proteoliposomen im gleichen Ausmaß auf hyperosmotische Bedingungen reagiert wie in intakten Zellen. Obwohl BetP komplett seiner zellulären Umgebung beraubt wurde, ist es bei einer niedrigen externen Osmolalität inaktiv und bei einer hohen externen Osmolalität aktiv. Dies bedeutet, dass BetP auch in Proteoliposomen seine Eigenschaften als Osmosensor und auch als Osmoregulator beibehält. Diese Tatsache beantwortet gleichzeitig auch die erste Frage in Bezug auf die Reizwahrnehmung von BetP. Da Proteoliposomen aus prinzipiellen Gründen keinen

Turgordruck aufbauen können und BetP in Proteoliposomen dennoch osmoreguliert ist, ist es nicht möglich, dass der Turgordruck eine große Rolle bei der Osmoregulation von BetP spielt. Die Beibehaltung der osmosensorischen und osmoregulatorischen Eigenschaften im rekonstituierten System wurde außerdem für den osmoregulierten sekundären Transporter ProP aus *E. coli* (Racher *et al.*, 1999) und für das osmoregulierte ABC-Transportsystem aus *Lactococcus lactis* (v.d.Heide & Poolman, 2000) gezeigt.

Da die osmosensorischen und osmoregulatorischen Eigenschaften von BetP in Proteoliposomen erhalten bleiben, ist es nun möglich, mit diesem System, das enorme experimentelle Vorteile bietet, herauszufinden, welcher aktivierende Reiz von BetP wahrgenommen wird.

4.2 Welcher Reiz wird von BetP wahrgenommen ?

Werden Zellen oder Proteoliposomen hyperosmotischen Bedingungen ausgesetzt, wird nicht nur die externe Osmolalität erhöht, sondern es werden auch zahlreiche weitere Parameter verändert. Die naheliegendsten Änderungen, von denen angenommen werden könnte, dass sie von in Membranen eingebetteten Osmosensorproteinen wahrgenommen werden, sind direkte Änderungen der Membranumgebung. Tatsächlich sind in den letzten Jahren die Einflüsse der Membranumgebung auf osmoregulierte Membranproteine in den Mittelpunkt des Interesses getreten (Wood, 1999; Cantor, 1999; v.d.Heide & Poolman, 2000). Es wird davon ausgegangen, dass eine durch hyperosmotischen Stress ausgelöste Volumenverringerng zu einer Erhöhung der Membranspannung führt (Csonka & Hanson, 1991; Bakker, 1993). Deshalb wurde der Einfluss der Membranspannung auf die Aktivierung von BetP untersucht, indem der Einfluss der Volumenverringerng der Proteoliposomen getrennt von anderen hyperosmotisch bedingten Faktoren betrachtet wurde. Interessanterweise haben alle diesbezüglich durchgeführten Versuche gezeigt, dass die Aktivierung von BetP völlig unabhängig von einer Änderung der Membranspannung ist (Abbildung 11 und Abbildung 14B). Darüberhinaus wurden Bedingungen gefunden, unter denen BetP voll aktiv war, obwohl kein hyperosmotischer Schock angelegt wurde! Zudem konnte ausgehend von diesem aktiven Zustand die Glycinbetainaufnahme von BetP durch einen hypoosmotischen Schock wieder reduziert werden (Abbildung 12). Das bedeutet, dass BetP nicht Änderungen der osmotischen Bedingungen sondern den „Ist-Zustand“ der zum jeweiligen Zeitpunkt vorliegenden osmotischen Bedingungen wahrnimmt. Mit anderen Worten hat BetP kein „Erinnerungsvermögen“, wie die Situation vor dem „Ist-Zustand“ gewesen ist.

Da die Aktivierung von BetP, wie gezeigt, nicht durch Änderungen der Membranspannung erfolgt, wurde untersucht, inwiefern Veränderungen der Zusammensetzung des externen und internen Mediums die BetP-Aktivierung beeinflussen. Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung von BetP in Abhängigkeit der externen Osmolalität sowohl durch eine Erhöhung der externen NaCl- als auch Prolin- oder Sorbitol-Konzentration erzielt werden konnte, ohne dass signifikante Unterschiede im Osmoregulationsverhalten von BetP beobachtet wurden. Da NaCl ein ionisches Solut, Prolin ein Zwitterion ohne Nettoladung und Sorbitol ungeladen ist, ist folglich die Aktivierung von BetP unabhängig von der Natur des externen Soluts.

Anders als bei der Wahl des externen Soluts ergaben sich drastische Unterschiede im Osmoregulationsverhalten von BetP bei einer Variation des internen Soluts. Wurde der interne KP_i -Puffer zu einem großen Teil durch Prolin ersetzt, so führte eine Erhöhung der externen Osmolalität zu keiner Aktivierung von BetP (Abbildung 13 und Abbildung 14). Um die in diesen Versuchen fehlende Aktivierung von BetP zu erklären, erscheint es auf den ersten Blick möglich, dass die erfolgten Variationen der internen Bedingungen die energetischen Voraussetzungen der Glycinbetainaufnahme beeinträchtigen. Folgende Überlegungen schließen aus, dass die fehlende Aktivität durch das Fehlen treibender Kräfte oder durch eine von Prolin ausgelöste Inaktivierung des Proteins verursacht wurde. 1.) Das chemische Na^+ -Potenzial als treibende Kraft der Glycinbetainaufnahme wurde in beiden Versuchsansätzen nicht variiert, da der externe Puffer mindestens 50 mM Na^+ -Ionen enthielt, während zum internen Puffer keine Na^+ -Ionen hinzugegeben wurden. Atomemissionsspektroskopische Messungen haben ergeben, dass das als interner Puffer verwendete Medium weniger als 10 μM Na^+ -Ionen enthielt. Wenn ein interner Puffer verwendet wurde, der 1 mM NaCl enthielt, reduzierte sich die GB-Aufnahmerate um nicht mehr als 20% (Daten nicht gezeigt). Das bedeutet, dass ein sehr hohes chemisches Na^+ -Potenzial für die Glycinbetainaufnahme zur Verfügung stand, selbst wenn der interne Puffer mit an BetP heftenden Na^+ -Ionen verunreinigt worden sein sollte. 2.) Das elektrische Potenzial als treibende Kraft der Glycinbetainaufnahme wurde ebenfalls nicht verändert. Wenn neben einer geringen KP_i -Konzentration Prolin als internes Solut verwendet wurde, war die interne K^+ -Konzentration zwar erheblich niedriger, als wenn ausschließlich KP_i als interner Puffer verwendet wurde. Da aber die Proteoliposomen im gleichen Puffer resuspendiert wurden, der auch im Inneren der Proteoliposomen vorlag, wurde durch eine 200-fache Verdünnung der Proteoliposomen im externen Puffer gewährleistet, dass das Verhältnis der internen zur externen K^+ -Konzentration beim Start der Aufnahmemessung in jedem Ansatz konstant gehalten wurde, wodurch gleichzeitig auch das anfängliche elektrische Potenzial in jedem

Ansatz gleich war. 3.) Es ist nicht auszuschließen, dass Prolin eine inaktivierende Wirkung auf BetP hat. Da Prolin ein kompatibles Solut ist, das von *C. glutamicum* akkumuliert wird, wäre es denkbar, dass Prolin einen *trans*-inhibitorischen Effekt auf die Aktivierung von BetP ausübt, um eine zu massive Akkumulation von kompatiblen Soluten im Zellcytoplasma zu verhindern. Ein entsprechender Effekt ist für das osmoregulierte Aufnahmesystem für Trimethylammonium-Verbindungen QacT aus *Lactobacillus plantarum* (Glaasker *et al.*, 1998) und für das osmoregulierte Aufnahmesystem für Glycinbetain und Carnitin aus *Listeria monocytogenes* Scott A (Verheul *et al.*, 1997) vorgeschlagen worden. Zwei Argumente sprechen gegen einen *trans*-inhibitorischen Effekt von Prolin auf BetP. Setzte sich der interne Puffer aus einer Mischung aus KP_i und Prolin zusammen, so stieg die GB-Aufnahmerate in Abhängigkeit der externen Osmolalität. Da unter diesen Bedingungen auch die interne Prolinkonzentration steigt, kann Prolin nicht inhibitorisch auf BetP wirken (Abbildung 13). Zum anderen waren die für Prolin beschriebenen Effekte auch zu beobachten, wenn anstatt Prolin Ectoin, Carnitin, Harnstoff oder Glukose verwendet wurde. Da zumindest die letzten beiden Solute keine kompatiblen Solute sind, ist es aus zellphysiologischer Sicht zumindest nicht naheliegend, warum sie einen inhibitorischen Effekt auf BetP ausüben sollten.

Da durch die oben beschriebenen Versuche ausgeschlossen werden konnte, dass BetP in Proteoliposomen weder durch Einflüsse von der Membran noch durch externe Einflüsse aktiviert wird, beschränkte sich die Suche nach dem BetP-aktivierenden Reiz in der Folge auf die Situation im Inneren der Proteoliposomen. Unter hyperosmotischen Bedingungen strömt Wasser innerhalb von Millisekunden aus den Vesikeln heraus (Verkman *et al.*, 1996), wobei das interne Volumen der Proteoliposomen drastisch erniedrigt wird. Da die Phospholipidmembran lateral nur zu einem sehr geringen Grad komprimiert werden kann, wird das Vesikelvolumen dadurch reduziert, dass die unter isoosmotischen Bedingungen kugelförmigen Vesikel nach Erhöhung der externen Osmolalität eine ovale, langgestreckte bzw. schlauchbootförmige Gestalt annehmen (Sackman, 1994; White *et al.*, 2000; Hallett, persönliche Mitteilung). Deshalb verursachen extreme hyperosmotische Bedingungen eine drastische Erhöhung der Konzentration der internen Solute und damit der internen Osmolalität.

Es wäre denkbar, dass BetP in der Lage ist, die interne Osmolalität *per se* wahrzunehmen. Wenn dies der Fall wäre, sollte die Osmolalitätswahrnehmung unabhängig von der Natur des internen Soluts sein. Bereits zuvor wurde jedoch erwähnt, dass BetP zwar aktiv ist, wenn die interne KP_i -Konzentration hoch genug ist, dass aber Prolin, Ectoin, Carnitin, Harnstoff bzw.

Glukose auf der Innenseite der Proteoliposomen auch in hohen Konzentrationen nicht zur Aktivierung von BetP beitragen. Um diese Aussage zu bekräftigen, wurden Versuche durchgeführt, in denen alle Parameter außer der internen Osmolalität konstant gehalten wurden. Deshalb wurden jeweils isoosmolale Bedingungen gewählt, das heißt, das interne und externe Medium der Proteoliposomen hatte jeweils die gleiche Osmolalität. Die Ergebnisse der Versuche zeigten, dass eine Erhöhung der internen Prolinkonzentration, wenn überhaupt, nur eine sehr geringe Aktivitätssteigerung von BetP bewirkte, während hohe interne KP_i -Konzentrationen zu sehr hohen Aktivitäten des Proteins führten (Abbildung 14A). Daraus kann geschlossen werden, dass die Aktivierung von BetP von der Natur des internen Soluts abhängig ist.

Während K^+ und Phosphat Ionen sind, hat Prolin keine Nettoladung. Deshalb wurde untersucht, ob die Aktivierung von BetP eventuell von der internen Ionenstärke abhängig ist. Wenn dies der Fall wäre, sollten alle Ionen im Inneren der Proteoliposomen zur Aktivierung von BetP beitragen. Allerdings wurde gezeigt, dass durch intern eingesetztes CholinCl oder NH_4Cl keine Aktivitätssteigerung von BetP erzielt wurde. Daraus konnte geschlossen werden, dass der BetP-aktivierende Reiz nicht die absolute interne Ionenstärke ist, sondern von dem spezifischen Einfluss eines Kations oder Anions abhängen muss. Um zu überprüfen, ob der BetP-aktivierende Einfluss des internen KP_i -Puffers vom Phosphat abhängig ist, wurden auch Versuche mit internem KCl und KGlu durchgeführt. Diese Solute zeigten eine fast gleich starke Aktivierung von BetP wie internes KP_i . Da BetP also durch internes KCl und KGlu aber nicht durch internes CholinCl oder NH_4Cl aktiviert werden kann, kann die Aktivierung von BetP durch internes KP_i weder auf die interne Phosphatkonzentration noch auf die generelle interne Anionenkonzentration zurückgeführt werden.

Da alle anderen Möglichkeiten ausgeschlossen wurden, ist die einzige mögliche Schlussfolgerung, dass die Aktivierung von BetP zumindest in Proteoliposomen durch die absolute interne K^+ -Konzentration bestimmt wird. Diese Aussage wird auch dadurch bestätigt, dass die BetP-Aktivierungskurven in Versuchen, in denen internes KP_i bzw. KCl oder KGlu eingesetzt wurde, erst dann deckungsgleich wurden, wenn sie gegen die interne K^+ -Konzentration aufgetragen wurden. Bis auf eine Ausnahme sprechen folgerichtig alle gewonnenen Daten dafür, dass die Aktivierung von BetP von der internen K^+ -Konzentration bestimmt wird. Die Ausnahme betrifft die Aktivierung von BetP unter isoosmolalen Bedingungen bei einer vorliegenden hohen internen K^+ -Konzentrationen, denn unter diesen Bedingungen wurde ein deutlich geringeres Aktivitätsmaximum erzielt als unter hyperosmolalen Bedingungen. Wenn

Proteoliposomen intern mit 135 mM K^+ -Ionen beladen wurden und die K^+ -Konzentration durch einen 2,5-fachen hyperosmotischen Schock auf 340 mM erhöht wurde, war die GB-Aufnahmerate circa 2,5-mal so hoch, als wenn Proteoliposomen intern mit 340 mM K^+ -Ionen beladen und isoosmolalen Bedingungen ausgesetzt wurden (Abbildung 17 im Vergleich zu Abbildung 14A). Es ist schwierig, für die unterschiedlich hohen Aktivitätsraten eine Erklärung zu finden, da in beiden Versuchen unmittelbar nach Beginn der Aufnahmemessung die interne K^+ -Konzentration 340 mM betrug, weshalb die Glycinbetain-Aufnahmerate in beiden Fällen eigentlich gleich hoch sein sollte. Eine Erklärung könnte sein, dass die Osmolalität des Puffers, der während der Extrusion der Proteoliposomen verwendet wurde, eventuell Einfluss auf die Qualität der hergestellten Proteoliposomen hat. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die höhere Glycinbetain-Aufnahmerate weder direkt noch indirekt durch die Volumenverringering der hyperosmolal gestressten Proteoliposomen verursacht wurde, da in einem Kontrollversuch die GB-Aufnahmerate isoosmolal behandelte Proteoliposomen durch einen zusätzlich angelegten hyperosmolalen Schock nicht gesteigert wurde (Abbildung 14B).

Eine Aktivierung von BetP konnte nicht nur durch eine hohe interne K^+ -Konzentration sondern auch durch eine entsprechend hohe interne Rb^+ - bzw. Cs^+ -Konzentration erzielt werden. Genauso wie K^+ -Ionen sind auch Rb^+ - und Cs^+ -Ionen Alkalimetall-Kationen, wobei sich diese geringfügig in ihrem Ionenradius unterscheiden; die Ionenradien von K^+ , Rb^+ und Cs^+ liegen bei 133, 149 bzw. 165 pm (Kindler & Glied). Die geringen Unterschiede zwischen den Ionenradien verdeutlichen, dass es kaum funktionelle Unterschiede zwischen den Ionen gibt. In der Tat ist bisher erst ein Proteinsystem bekannt, das spezifisch zwischen K^+ und Rb^+ unterscheiden kann; dies ist das K^+ -Aufnahmesystem Kdp aus *E. coli* (Rhoads *et al.*, 1977). Interessanterweise kann BetP wahrscheinlich nicht durch eine hohe interne NH_4^+ -Konzentration aktiviert werden, obwohl dessen Ionenradius bei 148 pm liegt (Xiang *et al.*, 1996) und damit fast genauso groß ist wie Rb^+ . Dies könnte bedeuten, dass die Aktivierung von BetP nicht durch kationische Moleküle sondern nur durch Kationen der Alkalimetalle verursacht werden kann. Ob Na^+ - bzw. Li^+ -Ionen in der Lage sind, BetP zu aktivieren, konnte nicht untersucht werden, da bereits geringe Na^+ - bzw. Li^+ -Konzentrationen im Inneren der Proteoliposomen das chemische Na^+ - bzw. Li^+ -Potenzial drastisch reduzierten, wodurch die GB-Aufnahmerate von BetP erheblich erniedrigt wurde. Um diese noch offene Frage zu klären, ist es wahrscheinlich notwendig, die mögliche Aktivierung von BetP durch Na^+ - oder Li^+ -Ionen mit Methoden zu untersuchen, die unabhängig von einem vesikulären System sind. Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass zumindest im Proteoliposomensystem die Aktivierung von BetP durch eine hohe interne K^+ -Konzentration verursacht wird. Der

Bereich, in dem in diesem System unter den verwendeten Bedingungen eine Aktivitätssteigerung von BetP beobachtet wurde, liegt bei einer internen K^+ -Konzentration zwischen circa 150 und 350 mM, wobei die halbmaximale Aktivierung bei circa 250 mM liegt. Diese Werte sind nicht als vom System unabhängig für BetP geltende Werte anzusehen sondern nur als Richtwert, der mit der Situation in anderen Systemen verglichen werden kann. Eine interessante Schlussfolgerung aus der gezeigten K^+ -Abhängigkeit der BetP-Aktivierung ist, dass BetP nun nicht nur als Osmosensor sondern zugleich auch als Chemosensor beschrieben werden kann, da das Protein in der Lage ist, unabhängig von einem angelegten Osmostress die Konzentration eines Ions wahrzunehmen.

4.3 Übertragung der Ergebnisse auf die Situation in Zellen

Da das Proteoliposomensystem nur ein Hilfssystem ist, um die Funktion eines Proteins besser untersuchen zu können, ist es notwendig, die in diesem System gewonnenen Erkenntnisse im zellulären System zu bestätigen. Aus einer theoretischen Betrachtungsweise heraus ist es durchaus denkbar, dass die Aktivierung von BetP auch in Zellen von der internen K^+ -Konzentration abhängig ist, da aufgrund hyperosmotischer Stressbedingungen Wasser aus den Zellen herausfließt, wodurch die interne K^+ -Konzentration in Abhängigkeit der Verringerung des Zellvolumens steigt. Neben diesem ersten Zeitfenster, in dem die interne K^+ -Konzentration innerhalb einiger Millisekunden ansteigt, erhöht sich in einem zweiten Zeitfenster, das einige Minuten andauert, die interne K^+ -Konzentration durch die Aktivität von K^+ -Aufnahmesystemen, die unter hyperosmotischen Stressbedingungen K^+ -Ionen aufnehmen. In einem dritten Zeitfenster passt sich die Zelle über Stunden hinweg an die neuen osmotischen Bedingungen an, indem sie hyperosmotisch regulierte Gene exprimiert und cytoplasmatische K^+ -Ionen teilweise durch kompatible Solute, die in dieser Phase akkumuliert werden, ersetzt. Genauso wie im Proteoliposomensystem wurden auch in den im folgenden beschriebenen Versuchen mit intakten Zellen nur die Änderungen der Aktivität von BetP innerhalb des ersten Zeitfensters untersucht.

Es ist möglich, den Einfluss der internen K^+ -Konzentration auf die Aktivität von BetP sowohl in *C. glutamicum* als auch in *E. coli* zu überprüfen. Da für die eingesetzten Proteoliposomen Phospholipide aus *E. coli* verwendet wurden, wurde entschieden, die entsprechenden Versuche in *E. coli* durchzuführen, um die Daten aus den beiden Systemen besser miteinander vergleichen zu können. Ziel der *in vivo*-Versuche war es, die Abhängigkeit der internen K^+ -Konzentration in *E. coli* auf die Aktivität von BetP zu untersuchen. Im Rahmen dieser

Arbeit ist es nicht mehr gelungen, eine klare Aussage über die K^+ -Abhängigkeit von BetP in *E. coli* zu treffen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Zellen, die von der Anzucht bis zur Aufnahmemessung jeweils mit Puffern gleicher Osmolalität behandelt wurden, signifikante GB-Aufnahmeraten zeigten. Da die plasmidvermittelte Expression von BetP unabhängig von den osmotischen Bedingungen erfolgte, bedeutet dies, dass zur Aktivierung von BetP kein hyperosmotischer Stress notwendig ist, sondern dass hierfür die Osmolalität des externen Puffers eine entscheidene Rolle zu spielen scheint. Diese Aussage wird durch frühere Versuche in *C. glutamicum* bestätigt. So konnte gezeigt werden, dass die GB-Aufnahmeraten von hyperosmotisch geschockten *C. glutamicum*-Zellen nicht mehr als doppelt so hoch waren als von *C. glutamicum*-Zellen, deren Anzucht- und Waschpuffer die gleiche Osmolalität hatten wie der hochosmolale Aufnahmepuffer (Farwick, 1994). Dieses Ergebnis kann so interpretiert werden, dass für die Aktivität von BetP die Osmolalität der Umgebung, in der die Zellen vor der Transportmessung vorlagen, relativ unwichtig ist und die Osmolalität des Aufnahmepuffers viel entscheidender ist. Es ist jedoch zu bedenken, dass *C. glutamicum* in diesem Versuch aufgrund des hochosmolalen Anzuchtmediums mehr *betP* exprimierte als in dem niedrigosmolalen (Farwick *et al.*, 1995).

In Versuchen mit *E. coli*-Zellen konnte zwar eine Abhängigkeit der BetP-Aktivität von der internen K^+ -Konzentration nachgewiesen werden, jedoch war die Abhängigkeit viel geringer als erwartet. Die Daten könnten so gedeutet werden, dass BetP in *E. coli* auch bei sehr niedrigen internen K^+ -Konzentrationen aktiv ist. Jedoch waren die gemessenen internen K^+ -Konzentrationen wahrscheinlich viel zu niedrig, da physiologische cytoplasmatische K^+ -Konzentrationen im Bereich von circa 175 bis über 500 mM liegen (Roe *et al.*, 2000). Es ist also durchaus möglich, dass die Aktivität von BetP auch in Zellen von der internen K^+ -Konzentration bestimmt wird, dass es aber bisher nicht gelungen ist, den K^+ -Konzentrationsbereich, in dem BetP in *E. coli*-Zellen aktiv ist, zu bestimmen.

Dass osmoregulatorische Prozesse in der Tat von der internen K^+ -Konzentration abhängen können, wurde erstmals in den achtziger Jahren vorgeschlagen, wobei die Abhängigkeit der Expression des osmoregulierten *proU*-Gens von der internen K^+ -Konzentration beschrieben wurde (Sutherland *et al.*, 1986). Basierend auf diesen Daten wurde auch eine K^+ -abhängige Aktivierung von osmoregulierten Transportproteinen auf Aktivitätsebene vorgeschlagen, ohne dass experimentelle Daten zur Unterstützung dieser Hypothese dargelegt wurden (Higgins *et al.*, 1987; Booth & Higgins, 1990). Erste diesbezügliche Daten erbrachten Untersuchungen an der osmoregulierten Sensor kinase KdpD aus *E. coli* durch Messungen mit Membranvesikeln, die eine Abhängigkeit der Aktivierung der Kinase zumindest von der internen Ionenstärke

darlegten (Jung *et al.*, 2000). Außerdem haben jüngste Untersuchungen mit der osmoregulierten Sensorkinase EnvZ aus *E. coli* mit Proteoliposomen und Membranvesikeln gezeigt, dass die Aktivierung der Kinase von der internen K^+ -Konzentration abhängig ist, wobei die aktivierende K^+ -Konzentration in beiden Systemen deutlich unterschiedlich war (Jung, persönliche Mitteilung).

4.4 Einflüsse der Membranumgebung

Untersuchungen mit intakten Zellen hatten ergeben, dass die externe Osmolalität, bei der die maximale BetP-Aktivität erreicht wurde, in *C. glutamicum* und *E. coli* deutlich unterschiedlich war (Peter *et al.*, 1996; Abbildung 20B). Die Ursache dieses deutlichen Unterschieds in der Osmoregulation sollte mit Hilfe des Proteoliposomensystems untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Verschiebung des Osmolalitätsoptimums nicht in den deutlich unterschiedlichen Turgordrücken der beiden Gram-positiven bzw. Gram-negativen Bakterien begründet liegt, sondern wahrscheinlich durch die unterschiedliche Phospholipidzusammensetzung der Cytoplasmamembran der beiden Organismen erklärt werden kann. Die *E. coli*-Plasmamembran besteht aus 80% Phosphatidylethanolamin (PE), 15% Phosphatidylglycerin (PG) und 5% Diphosphatidylglycerin (DPG, Cardiolipin) (Prasad, 1996), während die *C. glutamicum*-Plasmamembran aus 87% PG, 5% Phosphatidylinositolmannosid, 3% Phosphatidylinositol, 2,5% Phosphatidsäure und 1% DPG besteht (Hoischen & Krämer, 1990). Über die Bedeutung der Interaktionen von integralen Membranproteinen mit ihrer Lipidumgebung ist bisher nur sehr wenig bekannt (Veld *et al.*, 1993), jedoch lassen sich den verschiedenen Phospholipiden neben den Einflüssen ihrer Fettsäuren zwei Eigenschaften zuordnen, die bei der Interaktion mit Membranproteinen eine Rolle spielen könnten: 1.) die Eigenschaft, eine Lipiddoppelschicht ausbilden zu können (bzw. die Membranspannung zu erniedrigen) und 2.) die Ladung der Kopfgruppe (Dowhan, 1997). Um zu entscheiden, welche der beiden Eigenschaften das Osmolalitätsoptimum von BetP beeinflusst, wurden neben Phospholipiden aus *E. coli*, das zu 80% aus PE (bildet ohne Zugabe anderer Phospholipide keine Lipiddoppelschicht aus; keine Nettoladung) besteht, zwei weitere Phospholipide für die Rekonstitution verwendet: PG (Lipiddoppelschicht-Bildner; negative Nettoladung) und Phosphatidylcholin (PC; Lipiddoppelschicht-Bildner; keine Nettoladung) (Dowhan, 1997). Es ist sehr wahrscheinlich, dass nicht die Eigenschaft der Phospholipide, Lipiddoppelschichten ausbilden zu können, für die Verschiebung des Osmolalitätsoptimums verantwortlich ist sondern die Ladung der Kopfgruppe. Je höher der Anteil an negativ geladenen

Phospholipiden in der Membran war, umso weiter war das Aktivitätsoptimum von BetP zu höheren Osmolalitätswerten verschoben. Der Einfluss von negativ geladenen Phospholipiden konnte im Übrigen auch für die Sensor kinase KdpD aus *E. coli* gezeigt werden, die im rekonstituierten System nur aktiv ist, wenn ein Teil der Phospholipide negativ geladen ist (Stallkamp *et al.*, 1999).

Hinweise dafür, dass die Ladung der Membranoberfläche für die Aktivität von BetP wichtig ist, ergaben auch Versuche mit dem Lokalanästhetikum Tetracain. Da Tetracain dafür bekannt ist, sich in die Phospholipidmembran einzulagern und so die Membranspannung zu beeinflussen (Auger *et al.*, 1988), wird es häufig dafür verwendet, den Einfluss der Membranspannung auf die Aktivität eines Membranproteins zu untersuchen (z.B. Martinac *et al.*, 1990). Tetracain kann jedoch auch sowohl ungeladen als auch positiv geladen vorliegen und es ist bekannt, dass sowohl die ungeladene als auch die geladene Form von Tetracain die Aktivität von Membranproteinen beeinflussen kann (Lambert *et al.*, 1995 bzw. Wolosker *et al.*, 1992). Es wurden Hinweise darauf gefunden, dass die Erhöhung der Aktivität von BetP durch Zugabe von geringen Konzentrationen an Tetracain nicht durch dessen Eigenschaft, die Membranspannung zu verändern, oder durch den Einfluss von ungeladenem Tetracain verursacht wurde sondern durch den Einfluss von positiv geladenem Tetracain (Abbildung 22).

Bei gemeinsamer Betrachtung der Einflüsse der Phospholipidumgebung sowie des Tetracains auf die Aktivierung von BetP, wäre eine mögliche Erklärung für die beschriebenen Auswirkungen, dass eine neutrale bzw. positiv geladene Phospholipidumgebung die Aktivierung von BetP erleichtert. Da die Aktivierung von BetP, wie oben ausführlich beschrieben, von der internen K^+ -Konzentration abhängig ist, wäre es auch möglich, dass die für die Aktivierung von BetP benötigte interne K^+ -Konzentration umso niedriger ist, je positiv geladener die Phospholipidumgebung von BetP ist. Da eventuell die positiv geladene C-terminale Extension von BetP bei der Aktivitätsregulation eine Rolle spielt, wurde im folgenden die Orientierung des Proteins sowohl in intakten Zellen als auch in Proteoliposomen und der mögliche Einfluss der C-Extension auf die Aktivität von BetP untersucht.

4.5 Untersuchungen zur Orientierung von BetP

Um Aussagen darüber treffen zu können, welche Domänen im BetP-Protein bei der Osmo-stresswahrnehmung und -regulation beteiligt sind, war es notwendig, die Orientierung von BetP sowohl in intakten Zellen als auch in Proteoliposomen experimentell nachzuweisen. Es wurde gezeigt, dass die Orientierung von BetP in intakten Zellen mit dem Topologiemodell,

das mit dem Computerprogramm PHDThtm (Rost *et al.*, 1995) ermittelt wurde (Abbildung 3), übereinstimmt, das heißt, die Extensionen liegen auf der cytoplasmatischen Seite der Membran. Grundlage des Nachweises war eine Methode zum immunologischen Nachweis von bakteriellen Oberflächenproteinen (Burkovski, 1997), wobei in diesem Fall die immunologische Reaktion des N- bzw. C-terminal an BetP fusionierten Strep-tagII mit dem Streptavidin-AP-Konjugat nachgewiesen wurde. Es konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß dieser immunologischen Reaktion sehr viel intensiver war, wenn aus BetP-exprimierenden *E. coli*-Zellen invertierte Membranvesikel präpariert wurden als wenn diese sphäroplastiert wurden (Abbildung 23). Diese Beobachtung gibt einen eindeutigen Hinweis darauf, dass die Extensionen erst für das Konjugat zugänglich wurden, als aus den Zellen invertierte Membranvesikel hergestellt wurden, weshalb eine cytoplasmatische Lokalisation der Extensionen sehr wahrscheinlich ist.

Für eine weitergehende Bestätigung des vorliegenden Topologiemodells wurde nachgewiesen, dass die hydrophilen Schleifen zwischen der ersten und zweiten bzw. zwischen der vorletzten und letzten putativen Transmembranregion von BetP zur externen Seite der Membran gerichtet sind. Der Nachweis erfolgte mit einer Methode, in der ausgehend von einem Cystein-freien Membranprotein einzelne Aminosäuren gegen Cystein ausgetauscht werden und deren Zugänglichkeit für das thiol-spezifische Reagenz 4-Acetamino-4'-maleimidylstilben-2,2'-disulfonat (SM) getestet wird, wobei eine Bindung nur auf der externen Seite der Membran erfolgen kann, da SM membranimpermeabel ist (Kimura *et al.*, 1997; Jung *et al.*, 1998b). Mit Hilfe dieser Methode wurde gezeigt, dass in BetP die Serinreste an Position 89 und 516, die nach dem vorliegenden Topologiemodell zur externen Seite gerichtet sind, für SM zugänglich waren, wodurch die Bindung von 3-(N-Maleimidylpropionyl)-Biocytin (BM) an die Thiolgruppe des Cysteins unterbunden wurde und folglich immunologisch nicht durch Avidin-AP-Konjugat nachgewiesen werden konnte (Abbildung 25).

Zusammenfassend wurde die Orientierung von BetP mit Hilfe zweier methodisch völlig unabhängiger Versuchsansätze bestätigt. Des Weiteren wurde die Existenz der laut Topologiemodell ersten und zwölften Transmembrandomäne nachgewiesen, womit gleichzeitig gezeigt wurde, dass BetP eine gerade Anzahl von Transmembrandomänen enthält. Außerdem enthält die Vorhersage der Transmembrandomänen (Anhang 2) keine „unsicheren“ Vorhersagebereiche und zum anderen keinen spekulativen Spielraum für die Existenz von höchstens zehn bzw. mindestens vierzehn Transmembrandomänen. Deshalb ist fast sicher davon auszugehen, dass BetP aus genau zwölf Transmembrandomänen aufgebaut ist.

Da die meisten in dieser Arbeit beschriebenen funktionellen Studien an BetP in Proteoliposomen durchgeführt wurden, war es notwendig, auch in diesem System die Orientierung des Proteins zu ermitteln. Dies hätte es ermöglicht, die in Proteoliposomen beschriebenen Eigenschaften des Proteins konkreten Regionen innerhalb des Proteins zuzuordnen und konsequenter mit Erkenntnissen zu vergleichen, die in intakten Zellen gesammelt wurden (z.B. Peter *et al.*, 1998a). Zwar erfolgt der Einbau von Membranproteinen häufig unidirektional (z.B. Jung *et al.*, 1997; Jung *et al.*, 1998a), so dass eventuell strukturelle Eigenschaften des Proteins über dessen Orientierung während des Einbaus in die Membran entscheiden. Jedoch sind auch zahlreiche Beispiele bekannt, in denen Membranproteine in unterschiedlichen Orientierungen in die Membran eingebaut wurden (z.B. Steverding *et al.*, 1989; Fang *et al.*, 1999).

Bei der Bestimmung der Orientierung von BetP in Proteoliposomen war es trotz zahlreicher Versuche und methodischer Variationen nicht möglich, die oben für intakte Zellen beschriebene Methode, mit der die interne bzw. externe Zugänglichkeit von Cysteinresten untersucht wurde, auch erfolgreich auf Proteoliposomen anzuwenden, da eventuell 4-Acetamino-4'-maleimidylstilben-2,2'-disulfonat in Proteoliposomen anders als in intakten Zellen membranpermeabel ist. Eine weitere Methode, mit der die Orientierung von BetP in Proteoliposomen untersucht wurde, basierte auf der Tatsache, dass der am N-Terminus von BetP fusionierte Strep-tagII immunologisch mit dem Streptavidin-AP-Konjugat nachgewiesen werden konnte. Dabei wurden Strep-BetP enthaltene Proteoliposomen mit Triton X-100 teilweise oder vollständig solubilisiert und die beschriebene Immunreaktion mit der von nicht solubilierten Proteoliposomen verglichen. Unglücklicherweise beeinträchtigte das zugesetzte Detergenz wahrscheinlich auch die Funktion des Konjugats, so dass keine eindeutigen Aussagen über die Orientierung von BetP in Proteoliposomen getroffen werden konnten. Es ist nicht auszuschließen, dass BetP in beiden Orientierungen in Proteoliposomen eingebaut ist, wobei die Richtung des Substrattransports jedoch aufgrund des elektrochemischen Potentials in jedem Fall vorgegeben wäre. Außerdem ist nicht auszuschließen, dass ein Teil der BetP-Proteine nicht in die Membran eingebaut, sondern nur außen angelagert vorlag. Zusammenfassend ist die Orientierung von BetP in Proteoliposomen weiterhin ungeklärt.

4.6 Ein Blick in die Zukunft

Eine zentrale Frage, die im Anschluss an diese Arbeit geklärt werden soll, ist, welche Bereiche im BetP-Protein für die Osmostresswahrnehmung bzw. -regulation verantwortlich sind. Durch frühere Versuche mit am C-Terminus verkürzten BetP-Proteinen wurde gezeigt, dass das Fehlen der C-Extension zu keiner und Verkürzungen der C-Extension zu einer osmostressunabhängigen und damit deregulierten Glycinbetainaufnahme führten, wenn die rekombinanten Proteine in *C. glutamicum* exprimiert wurden (Peter *et al.*, 1998a). Interessanterweise war die Glycinbetainaufnahme dieser Proteine nicht dereguliert, wenn sie in *E. coli* synthetisiert wurden (Peter, 1998). Eine wichtige Frage in diesem Zusammenhang ist, ob diese Proteine, wenn sie gereinigt und in Liposomen rekonstituiert werden, reguliert oder dereguliert sind. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit die Gene der rekombinanten Proteine in den pASK-IBA5-Vektor kloniert, so dass an das Genprodukt N-terminal Strep-tagII fusioniert wurde. Aufgrund des Strep-tags war es nun auch anders als zuvor möglich, den Einbau der Proteine in die Cytoplasmamembran nachzuweisen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass auch BetP-Proteine mit fehlender C-Extension, die in *C. glutamicum* keine Glycinbetainaufnahme zeigten, in die Membran eingebaut wurden (Abbildung 28B). Außerdem wurde durch GB-Aufnahmemessungen in *E. coli* gezeigt, dass die rekombinanten Proteine, auch wenn in sehr unterschiedlichem Ausmaß, prinzipiell in der Lage sind, Glycinbetain aufzunehmen. Damit wurde die Grundlage für eine zukünftige erfolgreiche Rekonstitution dieser Proteine in Liposomen geschaffen. Durch eine Rekonstitution in *E. coli*-Liposomen im Vergleich zu Liposomen, die eher die Phospholipidumgebung der *C. glutamicum*-Cytoplasmamembran widerspiegeln, könnte geklärt werden, ob die Unterschiede in der Osmoregulation der rekombinanten Proteine in *E. coli* und *C. glutamicum* durch die unterschiedliche Phospholipidumgebung erklärt werden können. Wenn dies der Fall wäre, könnte die C-Extension von BetP eine spezielle Anpassung an die Bedingungen in *C. glutamicum* darstellen. Unabhängig davon, ob die C-terminale Domäne von BetP essentielle Bedeutung für die Osmostresswahrnehmung und/oder -regulation hat oder lediglich eine Anpassung an die zellulären Bedingungen in *C. glutamicum* darstellt, ist es zur Kenntnis der Funktion von BetP unumgänglich, die Bedeutung dieser Domäne im Detail zu untersuchen. Eine Reihe weiterer interessanter Fragestellungen, die sich aufgrund der vorliegenden Arbeit ergeben haben, werden in zukünftigen Arbeiten ebenfalls eingehender untersucht werden. Dies betrifft zum Beispiel die Abhängigkeit der Osmostresswahrnehmung von der internen K^+ -Konzentration in intakten Zellen, wobei Ideen gefunden werden müssen, auf welche Art

und Weise die interne K^+ -Konzentration variiert werden kann, am besten ohne die Zellen unterschiedlichen osmotischen Bedingungen auszusetzen. Die Untersuchungen bezüglich der internen K^+ -Konzentration werden in Zukunft sicher nicht nur in *E. coli*-Zellen sondern auch mit *C. glutamicum*-Zellen durchgeführt werden, unter anderem auch weil die K^+ -Konzentration in Gram-positiven Bakterien höher ist als in Gram-negativen (Kakinuma & Igarashi, 1988; Caylay *et al.*, 1991). Interessant ist in diesem Zusammenhang, ob die unterschiedliche externe Osmolalität, bei der das Aktivitätsmaximum in den beiden Organismen erreicht wurde, von der internen K^+ -Konzentration abhängig ist. Außerdem muss der Einfluss von sogenannten „gebundenen“ bzw. „freien“ K^+ -Ionen im Cytoplasma bedacht werden. Die „gebundene“ K^+ -Fraktion gleicht die negativen Ladungen der cytoplasmatischen Makromoleküle aus, während die „freie“ K^+ -Fraktion die Ladungen von kleinen Anionen im Cytoplasma ausgleicht. Obwohl erst wenige Daten zu diesem Thema vorliegen, ist bekannt, dass sich das Verhältnis der „gebundenen“ zur „freien“ K^+ -Fraktion in Abhängigkeit der osmotischen Bedingungen verändert (McLaggan *et al.*, 1994).

Ein weiteres Thema, das in Zukunft näher betrachtet werden sollte, ist der im Rahmen dieser Arbeit nur in begrenztem Umfang untersuchte Einfluss von auf der Membran exponierten positiven bzw. negativen Ladungen auf die Osmoregulation. Sowohl der aktivitätsfördernde Einfluss des positiv geladenen Tetracains als auch der aktivitätsmindernde Einfluss des negativ geladenen Phospholipids PG deuten darauf hin, dass membranassoziierte Ladungen im Zusammenspiel mit positiv geladenen potenziellen Interaktionspartnern (K^+ -Ionen, C-Extension, hoch konservierte Schleife nach der achten Transmembrandomäne) wichtige Parameter im Zuge der Osmoregulation von BetP sein könnten.

Schließlich ist es auch notwendig, die Orientierung von BetP im Proteoliposomensystem zu kennen, um experimentelle Daten besser bestimmten Regionen im Protein zuzuordnen zu können. Eine mögliche Methode, die sich hier anbietet, ist der proteolytische Verdau von rekonstituiertem BetP mit Endoproteinasen, die nur nach bestimmten und extern liegenden Aminosäuren schneiden können, und anschließender Auftrennung der Proteinbruchstücke, um aufgrund deren Größe auf die Orientierung von BetP schließen zu können.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welcher Reiz unter hyperosmotischen Bedingungen von dem Glycinbetain-Transporter BetP aus *C. glutamicum* wahrgenommen wird und somit letztendlich zur Aktivierung des Proteins führt.

Zur Untersuchung dieser Frage wurde BetP in *E. coli*-Phospholipid-Liposomen rekonstituiert, da Proteoliposomen den Vorteil bieten, das interne und externe Medium sowie die Phospholipidzusammensetzung der Membran beinahe beliebig variieren zu können. Als Voraussetzung der Rekonstitution wurde BetP zuvor erfolgreich heterolog in *E. coli* synthetisiert und anschließend mit Hilfe einer StrepTactin-Affinitätschromatographie isoliert.

Die Bedingungen der Rekonstitution wurden hinsichtlich der Glycinbetain-Aufnahmeaktivität der Proteoliposomen optimiert. Eine anschließende Charakterisierung von BetP zeigte, dass sich die kinetischen Parameter von BetP in Proteoliposomen kaum von denen in *C. glutamicum*- und *E. coli*-Zellen unterscheiden und dass die Glycinbetainaufnahme wie in intakten Zellen von einem elektrochemischen Na^+ -Gradienten getrieben wird. Es wurde gezeigt, dass BetP in Proteoliposomen alle Eigenschaften eines Osmosensors und Osmoregulators beibehält, was nahelegt, dass zur Funktion von BetP keine weiteren zellulären Faktoren notwendig sind.

Durch einen hyperosmotischen Schock verändern sich zahlreiche Parameter, die alle für den BetP-aktivierenden Reiz in Frage kamen. So erhöht sich zum einen die Membranspannung der Proteoliposomen und zum anderen die Osmolalität, Ionenstärke und Solut-Konzentration des externen und internen Mediums. Im Laufe der Untersuchungen zur Bestimmung des BetP-aktivierenden Reizes konnte gezeigt werden, dass weder Änderungen der Membranspannung noch der Bedingungen auf der externen Seite der Proteoliposomen von BetP direkt wahrgenommen werden können. Es erwies sich, dass die Bedingungen im Inneren der Proteoliposomen entscheidenden Einfluss auf die Aktivierung von BetP haben. Es konnte gezeigt werden, dass dabei weder die interne Osmolalität noch die generelle Anionen- oder Kationenkonzentration eine Rolle spielt, sondern dass die Aktivierung von BetP ausschließlich von der internen Konzentration an K^+ -Ionen oder K^+ -ähnlicher Kationen abhängig ist. Anschließend wurde untersucht, inwiefern die nun vorliegende Modellvorstellung der Aktivierung von BetP durch die interne K^+ -Konzentration auf das physiologische System der intakten Zellen übertragen werden kann. Hinsichtlich dieser Untersuchungen wurden

Hinweise gefunden, dass die Aktivierung von BetP eventuell auch in intakten Zellen von der internen, das heißt cytoplasmatischen, K^+ -Konzentration abhängig ist.

Neben der Untersuchung des BetP-aktivierenden Reizes wurde außerdem der Einfluss der Zusammensetzung der Phospholipidmembran der Proteoliposomen auf das Osmoregulationsverhalten von BetP untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Phospholipidzusammensetzung der Proteoliposomen entscheidenden Einfluss auf die Höhe der externen Osmolalität hat, bei der die Transportaktivität maximal anstieg. Es wurden Hinweise gefunden, dass für diesen Anstieg ein umso höherer hyperosmotischer Stress vorliegen musste, je stärker negativ geladen die eingesetzten Phospholipide waren.

Die Orientierung von BetP in Proteoliposomen konnte nicht nachgewiesen werden, jedoch wurde die Orientierung von BetP in intakten Zellen, die mittels einer computergestützten Topologievorhersage vorgeschlagen worden war und deren Bestimmung für die spätere Suche nach funktionellen Domänen im Protein wichtig ist, durch zwei unabhängige Methoden bestätigt.

6 Anhang

6.1 BetP-Nukleotidsequenz in pASK-IBA5-*betP*

```

CCATCGAATGGCCAGATGATTAATTCCTAATTTTTGTTGACACTCTATCATTGATAGAGT 60
TATTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAATGAATAGTTTCGACAAAAATCT 120
                                     RBS          tetA-Promotor      XbaI
AGATAACGAGGGCAAAAAATGGCTAGCTGGAGCCACCCGAGTTTCGAAAAAGGCGCCGAG 180
          RBS          Start  NheI          Strep-tag II          BsaI
ACCACTACATCTGACCCAAATCCGAAACCGATAGTGGAGGATGCTCAGCCAGAGCAAAT 240
  2.AS von BetP
ACCGCAACCGAAGAAGTGGCGGGCTTGCTTGAGAATCCAACCTAACCTGGAAGGGAAACTG 300
GCCGACGCCGAAGAGGAAATTATCCTCGAAGGCGAAGACACCCAGGCCTCACTTAACTGG 360
TCAGTCATCGTTCCAGCCCTAGTCATTGTCTAGCGACAGTGGTGTGGGGTATCGGATTC 420
AAAGATAGCTTTACCAACTTTGCTAGTTCTGCGTTGTCAGCAGTAGTTGACAATCTCGGC 480
TGGGCCTTCATTTTGTGGCACAGTCTTTGTATTTTTTATCGTTGTTATCGCCGCTAGT 540
AAATTCGGCACGATTTCGCTTAGGCCGCATTGATGAAGCACCAGAGTTTCGCACGGTGTCA 600
TGGATTTCCATGATGTTTGGCTGCAGGTATGGGTATTGGTTTGATGTTCTACGGAACCACA 660
                                     PstI
GAACCTTTAACCTTCTACCGCAATGGTGTACCTGGACATGATGAACACAATGTTGGCGTT 720
GCTATGTCCACGACAATGTTCCACTGGACCTTGCATCCATGGGCTATCTACGCAATTGTG 780
                                     NcoI
GGCCTAGCCATTGCCTATTTCGACCTTCCGAGTGGGCCGTAAACAGCTTCTAAGCTCTGCA 840
TTCGTGCCACTCATTGGTGAAAAAGGTGCAGAAGGATGGTTGGGCAAGCTCATCGACATC 900
CTGGCGATTATCGCCACCGTATTTCGGCACGGCATGTTCCCTTGGCCTTGGTGCCCTGCAG 960
                                     PstI
ATTGGTGCAGGCCTGTCCGCAGCAAACATCATTGAAGATCCAAGCGATTGGACCATCGTT 1020
GGCATTGTTTTCTGTTTTGACCCTGGCATTATCTTCTCCGCTATTTCTGGTGTGGGCAAG 1080
GGAATCCAGTACCTCTCCAACGCCAACATGGTTCTGGCAGCTCTGCTCGCGATTTTCGTG 1140
TTCGTTGTCCGACCAACCGTGTTCGATTTTGAACCTGCTGCCAGGTTCTATTGGCAACTAC 1200
CTGTCCAACCTTCTTCAAATGGCAGGCCGCACTGCCATGAGTCCGACGGCACAGCAGGT 1260
GAGTGGCTAGGTAGCTGGACCATCTTCTACTGGGCATGGTGGATCTCTTGGTCAACCATTC 1320
                                     BstEII
GTAGGAATGTTCTTGGCACGTATTTCCCGTGGCCGCTCCATCCGTGAGTTCATCCTGGGC 1380
GTGTTGCTCGTCCCAGCAGGTGTGTCCACCGTATGGTTCTCCATTTTTGGTGGCACTGCG 1440
ATTGTCTTCGAACAAAATGGGGAATCCATTTGGGGTGTGGTGCAGCAGAAGAGCAGCTT 1500
TTTGGATTGCTTCATGCACCTCCAGGTGGGCAAATCATGGGCATCATCGCCATGATTTTG 1560
CTGGGTACTTTCTTCACTTCTGCTGACTCTGCTTCCACCGTCATGGGCACCATGAGT 1620
CAGCACGGCCAGCTGGAAGCCAACAAGTGGGTGACAGCTGCCTGGGGTGTGCTACCGCA 1680
GCTATTGGACTAACGCTATTGCTTTCTGGTGGTGACAATGCCTTGAGCAACTTGCAAAAC 1740
GTCACCATCGTGGCTGCAACACCATTCTTGTGTTGTGGTTATTGGATTGATGTTTGCCTTA 1800
GTCAAGGACTTAAGCAATGATGTGATCTACCTCGAGTACCGTGAGCAGCAACGCTTCAAC 1860
                                     XhoI
GCGCGCCTTGCCCGTGAACGTCGTGTTTACAATGAACACCGCAAGCGTGAACCTGGCTGCA 1920
AAGCGACGCAGGGAGCGTAAGGCGAGTGGCGCGGGGAAGCGTCGATAGAAGCTTGACCTG 1980
                                     Stop HindIII
TGAAGTGAAAAATGGCGCACATTGTGCGACATTTTTTTTTGTCTGCCGTTTACCGCTACTG 2040
.....GCCTTTTGCTCACATGACCCGACA 4944

```

6.2 Vorhersage der Transmembrandomänen von BetP

Die Vorhersage wurde mit dem Programm PHDThtm (Rost *et al.*, 1995) erstellt. Die schattierten Bereiche geben die putativen Transmembranregionen an. Die Dezimalkomma-
stelle der Wahrscheinlichkeit der Lokalisation der jeweiligen AS in einer Transmembran-
region (T; p(TMD)) bzw. in einer internen bzw. externen Schleife (i, o; p(loop)) ist
angegeben ; z.B. 5 entspricht p(0,5-0,6).

```
AS      | MTTSDPNPKPIVEDAQPEQITATEELAGLLENPTNLEGLKLADAEIIIILEGEDTQASLNW |
p(TMD)1 | 00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000 |
p(Loop)2 | 99999999999999999999999999999999999999999999999999999999999999 |
PHDThtm | iiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiii |
```

```
AS      | SVIVPALVIVLATVWVGIGFKDSFTNFASSALSAVVDNLGWAFILFGTVFVFFIVVIAAS |
p(TMD)  | 24688899999999998887643221111111111235677889999999999999998876 |
p(Loop) | 75311100000000011123567788888888764322110000000000000001123 |
PHDThtm | iTTTTTTTTTTTTTTTTTTooooooooooooooooTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTiii |
```

```
AS      | KFGTIRLGRIDEAPEFRTVSWISMMFAAGMGIGLMFYGTTEPLTFYRNGVPGHDEHNVGV |
p(TMD)  | 43210000000000000011246788899998888876421100000000000000000 |
p(Loop) | 56789999999999999875321110000111112357889999999999999999999 |
PHDThtm | iiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiitTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTToooooooooooooooooooo |
```

```
AS      | AMSTTMFHWTLHPWAIYAIIVGLAIAYSTFRVGRKQLLSSAFVPLIGEKGAEGWLGLKLIID |
p(TMD)  | 00001345678888989999999887653111000000000000000000000012457 |
p(Loop) | 9999865432111101000000011234688899999999999999999999999987542 |
PHDThtm | oooooooooTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiT |
```

```
AS      | LAIIATVFGTACSLGLGALQIGAGLSAANI IEDPSDWTIVGIVSVLTLAFIFSAISGVGK |
p(TMD)  | 88899999998888766542211000000111235788899999999999999988876532 |
p(Loop) | 111000000011112334577889999998887642111000000000000011123467 |
PHDThtm | TTTTTTTTTTTTTTTTTTooooooooooooooooTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTiiiiii |
```

```
AS      | GIQYLSNANMVLAAALLAIFVVFVVGPTVSI LNL LPSIGNYLSNFFQMAGRTAMSADGTAG |
p(TMD)  | 211111234678899999999999998887654322111000000000000000000000 |
p(Loop) | 78888876532110000000000011123456778889999999999999999999999999 |
PHDThtm | iiiiiiiiiitTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTToooooooooooooooooooooooooooooooo |
```

```
AS      | EWLGSWTIFYWAWWISWSPFVGMFLARISRGRSIREFILGVLLVPAGVSTVWVFSIFGGTA |
p(TMD)  | 00001356788999988889988876443111111123467888999999998887654 |
p(Loop) | 9999864321100001111001112356888888887653211000000001112345 |
PHDThtm | oooooooooTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiTTTTTTTTTTTTTTTTT |
```

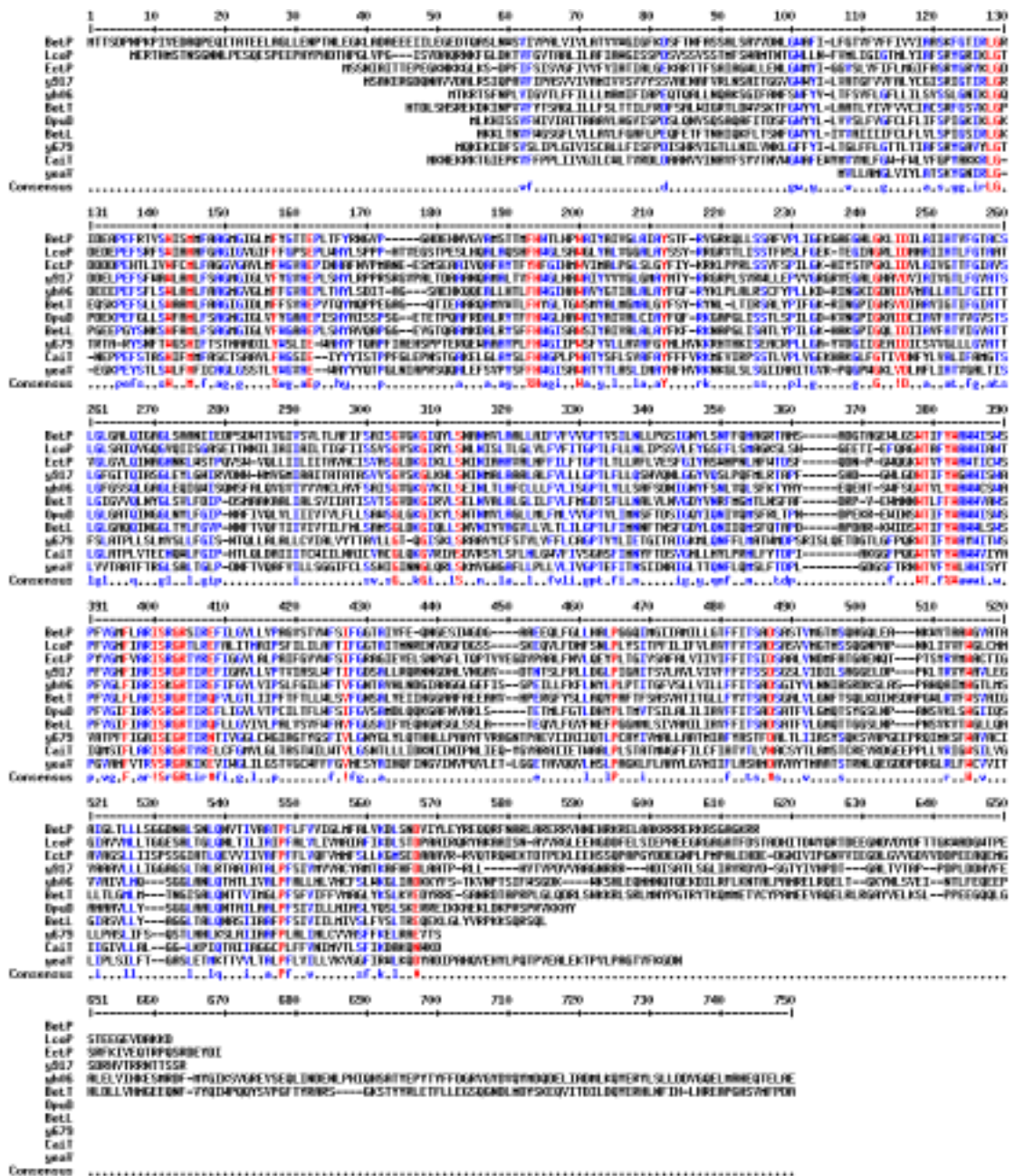
```
AS      | IVFEQNGESIWDGAAEEQLFGLLHALPGGQIMGIIAMILLGTFFFITSADSASTVMGTMS |
p(TMD)  | 321000000000000000000001112467889999999999999888754321000000 |
p(Loop) | 67899999999999999999999988875321100000000000001112456789999999 |
PHDThtm | oooooooooooooooooooooooooooooooooTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTiiiiiiiiiiiiii |
```

```
AS      | QHGQLEANKWVTAAWGVATAAIGLTL LLLSGDNALS NLQNV TIVAATPFLFVIGLMFAL |
p(TMD)  | 000000000013567888898887542211111124678899999999999988876 |
p(Loop) | 999999999986432111100111245778888888753211000000000001123 |
PHDThtm | iiiiiiiiiiiiiTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTooooooooooooTTTTTTTTTTTTTTTTTTTi |
```

```
AS      | VKDLSNDVIYLEYREQRFNARLARERRVHNEHRKRELA AKRRRERKASGAGKRR |
p(TMD)  | 42110000000000000000000000000000000000000000000000000000000000 |
p(Loop) | 57889999999999999999999999999999999999999999999999999999999999 |
PHDThtm | iiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiii |
```

6.3 BetP-Alignment mit anderen Mitgliedern der BCCT-Familie

Das Alignment wurde nach Corpet (1988) erstellt. Rot dargestellte Aminosäuren sind in allen, blau dargestellte in mindestens 50% der Proteine identisch.



6.4 Vergleich von BetP mit anderen Mitgliedern der BCCT-Familie

Tabelle 9: Vergleich von BetP mit anderen Mitgliedern der BCCT-Familie. Wesentliche Daten wurden mit Sequenzvergleich- und Sequenzanalyse-Systemen ermittelt (Corpet, 1988; Rost *et al.*, 1995; Bairoch *et al.*, 1997).

Protein (Identität)	Organismus	Substrat	osmo- reguliert	AS am Terminus	
				N-	C-
BetP (100%)	<i>C. glutamicum</i>	Glycinbetain	ja	61	56
LcoP (40%)	<i>C. glutamicum</i>	Ectoin, Glycinbetain, ?	ja	53	102
EctP (35%)	<i>C. glutamicum</i>	Ectoin, Prolin, Glycinbetain	ja	25	109
OpuD (46%)	<i>Bacillus subtilis</i>	Glycinbetain	ja	9	30
BetL (43%)	<i>Listeria monocytogenes</i>	Glycinbetain	ja	8	26
y917 (41%)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Glycinbetain	?	23	90
yh06 (38%)	<i>Haemophilus influenzae</i>	Cholin	?	11	182
BetT (35%)	<i>E. coli</i>	Cholin	(ja)	17	182
CaiT (28%)	<i>E. coli</i>	Carnitin	(nein)	14	12
y679 (? %)	<i>Treponema pallidum</i>	Carnitin (?)	?	13	11
yeaV (28%)	<i>E. coli</i> (keine 1.TMD)	Carnitin (?)	?	0	45

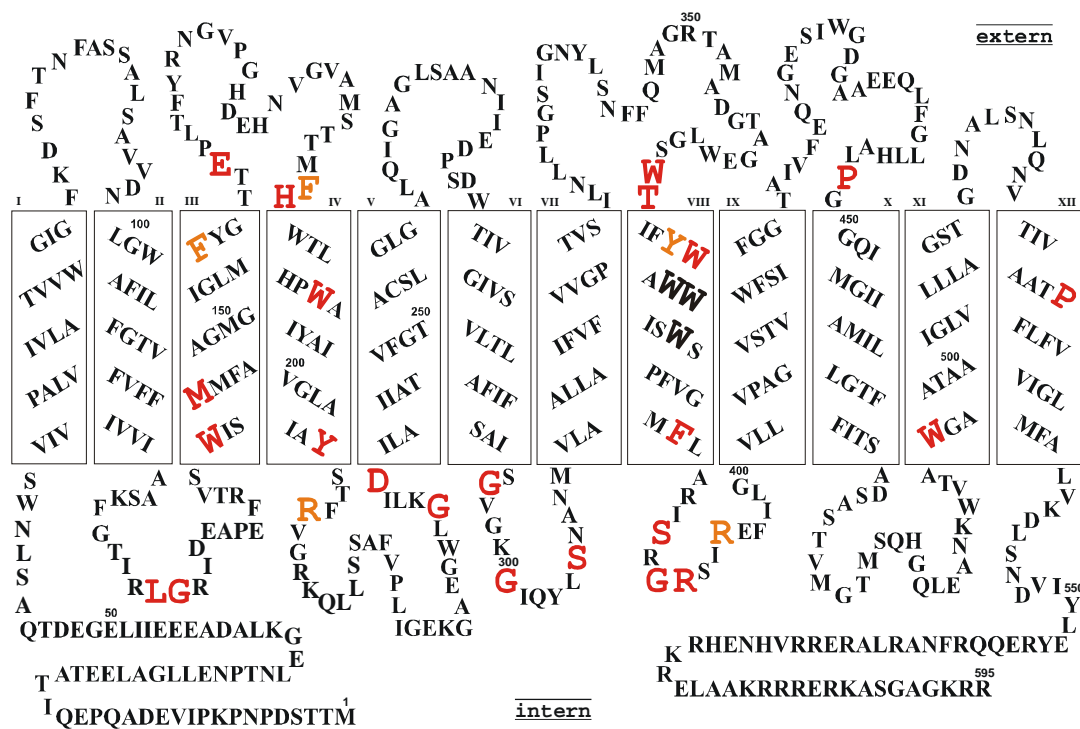


Abbildung 29: Hochkonservierte Aminosäuren in BetP. Aus den aus Tabelle 9 ermittelten Daten ergeben sich die dargestellten hochkonservierten Aminosäuren in BetP. Rot dargestellte AS sind in allen in Tabelle 9 aufgeführten Proteinen identisch. Orange dargestellte AS zeigen Positionen an, an denen entweder ein Tyr- oder Phe-Rest bzw. ein Arg- oder Lys-Rest eingebaut ist. Mindestens zwei der drei fett dargestellten Trp-Reste sind in allen in Tabelle 9 aufgeführten Proteinen eingebaut.

7 Literatur

- Auger, M., Jarell, H.C., Smith, I.C.P., Siminovitch, D.J., Mantsch, H.H. und Wong, P.T.T.** 1988. Effects of the local anesthetic tetracaine on the structural and dynamic properties of lipids in model membranes: a high-pressure Fourier transform infrared study. *Biochemistry* **27**: 6086-6093.
- Bairoch, A., Bucher, P. und Hofmann, K.** 1997. The PROSITE database, its status in 1997. *Nucl. Acids Res.* **25**: 217-221.
- Bakker, E.P. und Mangerich, W.E.** 1981. Interconversion of components of the bacterial proton-motive force by electrogenic potassium transport. *J. Bacteriol.* **147**: 820-826.
- Bakker, E.P.** 1993. Low-affinity K⁺ uptake systems, S. 253-275 in Bakker, E.P. (Ed.), Alkali cation transport systems in prokaryotes. CRC Press, Inc., Boca Raton, USA.
- Berrier, C., Coulombe, A., Szabo, I., Zoratti, M. und Ghazi, A.** 1992. Gadolinium ion inhibits loss of metabolites induced by osmotic shock and large stretch-activated channels in bacteria. *Eur. J. Biochem.* **206**: 559-565.
- Berrier, C., Besnard, M., Ajoux, B., Coulombe, A. und Ghazi, A.** 1996. Multiple mechanosensitive ion channels from *Escherichia coli*, activated at different thresholds of applied pressure. *J. Memb. Biol.* **151**: 175-187.
- Birnboim, H.C. und Doly, J.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Bishop, D.G., Rutberg, L. und Samuelsson, B.** 1967. The chemical composition of the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* **2**: 448-453.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H.J.** 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- Booth, I.R. und Higgins, C.F.** 1990. Enteric bacteria and osmotic stress: intracellular potassium glutamate as a secondary signal of osmotic stress? *FEMS Microbiol. Rev.* **6**: 239-246.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

- Burger, U.** 1999. Untersuchungen zur Substratspezifität an zwei osmoregulierten Carrier-Proteinen (BetP und EctP) in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit Universität Bonn.
- Burkovski, A.** 1997. Rapid detection of bacterial surface proteins using an enzyme-linked immunosorbent assay system. *J. Biochem. Biophys. Methods* **34**: 69-71.
- Cantor, R.S.** 1999. Lipid composition and the lateral pressure profile in bilayers. *Biophys. J.* **76**: 2625-2639.
- Cailay, S., Lewis, B.A., Guttman, H.J. und Record, M.T.** 1991. Characterisation of the cytoplasm of *Escherichia coli* K-12 as a function of external osmolarity. *J. Mol. Biol.* **222**: 281-300.
- Chung, C.T., Niemela, S.L. und Miller, R.H.** 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2172-2175.
- Cornelius, F.** 1991. Functional reconstitution of the sodium pump. Kinetics of exchange reactions performed by reconstituted Na/K-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **1071**: 19-66.
- Corpet, F.** 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* **16**: 10881-10890.
- Csonka, L.N.** 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**: 121-147.
- Csonka, L.N. und Hanson, A.D.** 1991. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 569-606.
- Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmid, R. und Bakker, E.P.** 1988. Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch. Microbiol.* **150**: 348-357.
- Dowhan, W.** 1997. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 199-232.
- Epand, R.M.** 1998. Lipid polymorphism and protein-lipid interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1376**: 353-368.
- Epstein, W.** 1986. Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**: 73-78.

- Fang, G., Friesen, R., Lanfermeijer, F., Hagting, A., Poolman, B. und Konings, W.N.** 1999. Manipulation of activity and orientation of membrane-reconstituted di-tripeptide transport protein DtpT of *Lactococcus lactis*. *Mol. Membr. Biol.* **16**: 297-304.
- Farwick, M.** 1994. Funktionelle Charakterisierung der Glycinbetain-Aufnahme durch *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit Universität zu Köln.
- Farwick, M., Siewe, R.M. und Krämer, R.** 1995. Glycine betaine uptake after hyperosmotic shift in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **177**: 4690-4695.
- Garner, M.M. und Burg, M.B.** 1994. Macromolecular crowding and confinement in cells exposed to hypertonicity. *Am. J. Physiol.* **266**: C877-C892.
- Glaasker, E., Konings, W.N. und Poolman, B.** 1996. Glycine betaine fluxes in *Lactobacillus plantarum* during osmostasis and hyper- and hypoosmotic shock. *J. Biol. Chem.* **271**: 10060-10065.
- Glaasker, E., Heuberger, E.H.M.L., Konings, W.N. und Poolman, B.** 1998. Mechanism of osmotic activation of the quaternary ammonium compound transporter (QacT) of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **180**: 5540-5546.
- Grant, S.G.N., Jessee, J., Bloom, F.R. und Hanahan, D.** 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4645-4649.
- Grothe, S., Krogsrud, R.L., McLellan, D.J., Milner, J.L. und Wood, J.M.** 1986. Proline transport and osmotic stress response in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **166**: 253-259.
- van der Heide, T. und Poolman, B.** 2000. Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *PNAS* **97**: 7102-7106.
- Higgins, C.F., Cairney, J., Stirling, D.A., Sutherland, L. und Booth, I.R.** 1987. Osmotic regulation of gene expression: ionic strength as an intracellular signal? *TIBS* **12**: 339-344.
- Hinkle, P.C., Kim, J.J. und Racker, E.** 1972. Ion transport and respiratory control in vesicles formed from cytochrome oxidase and phospholipids. *J. Biol. Chem.* **247**: 1338-1339.
- Hoischen, C. und Krämer, R.** 1990. Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **172**: 3409-3416.
- Inoue, H., Nojima, H. und Okajama, H.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.

- Jung, H., Tebbe, S., Schmid, R. und Jung, K.** 1998a. Unidirectional reconstitution and characterisation of purified Na⁺/proline transporter of *Escherichia coli*. *Biochem.* **37**: 11083-11088.
- Jung, H., Rübenhagen, R., Tebbe, S., Leifker, K., Tholema, N., Quick, M. und Schmid, R.** 1998b. Topology of the Na⁺/proline transporter of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **273**: 26400-26407.
- Jung, K., Tjaden, B. und Altendorf, K.** 1997. Purification, reconstitution, and characterization of KdpD, the turgor sensor of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **272**: 10847-10852.
- Jung, K., Veen, M. und Altendorf, K.** 2000. K⁺ and ionic strength directly influence the autophosphorylation activity of the putative turgor sensor KdpD of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**: 40142-40147.
- Kakinuma, Y. und Igarashi, K.** 1988. Active potassium extrusion regulated by intracellular pH in *Streptococcus faecalis*. *J. Biol. Chem.* **263**: 14166-14170.
- den Kamp, J.A., Redai, I. und van Deenen, L.L.** 1969. Phospholipid composition of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **99**: 298-303.
- Kappes, R.M., Kempf, B. und Bremer, E.** 1996. Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterisation of OpuD. *J. Bacteriol.* **178**: 5071-5079.
- Kappes, R.M. und Bremer, E.** 1998. Response of *Bacillus subtilis* to high osmolarity: uptake of carnitine, crotonobetaine and γ -butyrobetaine via the ABC transport system OpuC. *Microbiology* **144**: 83-90.
- Kempf, B. und Bremer, E.** 1995. OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **270**: 16701-16713.
- Kempf, B. und Bremer, E.** 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* **170**: 319-330.
- Kimura, T., Ohnuma, M., Sawai, T. und Yamaguchi, A.** 1997. Membrane topology of the transposon 10-encoded metal-tetracycline/H⁺ antiporter as studied by site-directed chemical labeling. *J. Biol. Chem.* **272**: 580-585.
- Kindler und Glied GbR.** UNI TERRA, Berlin. http://www.unitererra.de/rutherford/tab_ior.htm.

- Kinoshita, S., Udaka, S. und 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.
- Koo, S.P., Higgins, C.F. und Booth, I.R.** 1991. Regulation of compatible solute accumulation in *Salmonella typhimurium*: evidence for a glycine betaine efflux system. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 2527-2540.
- Krämer, R. und Klingenberg, M.** 1977. Reconstitution of adenine nucleotide transport with purified ADP, ATP-carrier protein. *FEBS Lett.* **82**: 363-367.
- Kruse, D.** 2000. Threoninaufnahme und Threoninexkretion in *Escherichia coli*: molekulare, biochemische und biotechnologische Aspekte. Dissertation Universität zu Köln.
- Kyhse-Andersen, J.** 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**: 203-209.
- 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. und Krämer, R.** 1995. Triggering glutamate excretion in *Corynebacterium glutamicum* by modulating the membrane state with local anesthetics and osmotic gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4334-4342.
- Landfald, B. und Strøm, A.R.** 1986. Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **165**: 849-855.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. und Parker, J.** 1997. *Brock: Biology of microorganisms*, 8. Aufl., Prentice Hall International, Inc., New Jersey.
- Martin, D.D., Ciulla, R.A. und Roberts, M.F.** 1999. Osmoadaptation in Archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1815-1825.
- Martinac, B., Adler, J. und Kung, C.** 1990. Mechanosensitive ion channels of *E. coli* activated by amphipaths. *Nature* **348**: 261-263.
- McLaggan, D., Naprstek, J., Buurman, E.T. und Epstein, W.** 1994. Interdependence of K⁺ and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**: 1911-1917.
- Minton, A.P.** 1997. Influence of excluded volume upon macromolecular structure and associations in 'crowded' media. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**: 65-69.

- Müller, W., Weber, H., Meyer, F. und Weissmann, C.** 1978. Site-directed mutagenesis in DNA: generation of point mutations in cloned beta globin complementary dna at the positions corresponding to amino acids 121 to 123. *J. Mol. Biol.* **124**: 343-358.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Ehrlich H.** 1992. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology* **24**: 17-27.
- Munro, G.F., Hercules, K., Morgan, J. und Sauerbier, W.** 1972. Dependence of the putrescine content of *Escherichia coli* on the osmotic strength of the medium. *J. Biol. Chem.* **247**: 1272-1280.
- Nottebrock, D.** 2000. Mechanosensitive Kanäle in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit Universität zu Köln.
- Perroud, B. und Le Rudelier, D.** 1985. Glycine betaine transport in *Escherichia coli*: osmotic modulation. *J. Bacteriol.* **161**: 393-401.
- Peter, H., Burkovski, A. und Krämer, R.** 1996. Isolation, characterisation, 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., Burkovski, A. und Krämer, R.** 1998a. Osmo-sensing by N- and C-terminal extensions of the glycine betaine uptake system BetP of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* **273**: 2567-2574.
- Peter, H., Weil, B., Burkovski, A., Krämer, R. und Morbach, S.** 1998b. *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: identification, sequencing, and characterisation of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP. *J. Bacteriol.* **180**: 6005-6012.
- Peter H.** 1998. Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Aufnahme von osmoprotektiven Substanzen bei *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Poolman, B. und Glaasker, E.** 1998. Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol.* **29**: 397-407.
- Prasad, R.** 1996. *Manual on Membrane Lipids*, Springer, Heidelberg.

- Racher, K.I., Voegelé, R.T., Marshall, E.V., Culham, D.E., Wood, J.M., Jung, H., Bacon, M., Cairns, M.T., Ferguson, S.M., Liang, W.J., Henderson, P.J.F., White, G. und Hallett, F.R.** 1999. Purification and reconstitution of an osmosensor: transporter ProP of *Escherichia coli* senses and responds to osmotic shifts. *Biochem.* **38**: 1676-1684.
- Rhoads, D.B., Woo, A. und Epstein, W.** 1977. Discrimination between Rb^+ and K^+ by *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **469**: 45-51.
- Rigaud, J.L., Pitard, B. und Levy, D.** 1995. Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1231**: 223-246.
- Roe, A.J., McLaggan, D., O'Byrne, C.P. und Booth, I.R.** 2000. Rapid inactivation of the *Escherichia coli* Kdp K^+ uptake system by high potassium concentrations. *Mol. Microbiol.* **35**: 1235-1243.
- Rönsch, H.** 2000. Untersuchungen zum Einfluss der Osmoregulation auf die Aminosäureproduktion mit *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation Universität zu Köln.
- Rost, B., Fariselli, P., Casadio, R. und Sander, C.** 1995. Prediction of transmembrane helices segments at 95 % accuracy. *Prot. Science* **4**: 521-533.
- Rübenhagen, R., Rönsch, H., Jung, H., Krämer, R. und Morbach, S.** 2000. Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* **275**: 735-741.
- Ruffert, S., Lambert, C., Peter, H., Wendisch, V.F. und Krämer, R.** 1997. Efflux of compatible solutes in *Corynebacterium glutamicum* mediated by osmoregulated channel activity. *Eur. J. Biochem.* **247**: 572-580.
- Ruffert, S., Berrier, C., Krämer, R. und Ghazi, A.** 1999. Identification of mechanosensitive ion channels in the cytoplasmic membrane of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **181**: 1673-1676.
- Sackman, E.** 1994. Membrane bending energy concept of vesicle- and cell-shapes and shape-transitions. *FEBS Lett.* **346**: 3-16.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning: A laboratory manual (2nd ed.). *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, New York, USA.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.

- Schaffner, W. und Weissmann, C.** 1973. A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal. Biochem.* **56**: 502-514.
- Schleyer, M., Schmid, 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.
- Schmidt, T.G.M., Koepke, J., Frank, R. und Skerra, A.** 1996. Molecular interaction between the *Strep*-tag affinity peptide and its cognate target streptavidin. *J. Mol. Biol.* **255**: 753-766.
- Schneider, E. und Altendorf, K.** 1987. Bacterial adenosine 5'-triphosphate synthase (F1F0): purification and reconstitution of F0 complexes and biochemical and functional characterization of their subunits. *Microbiol. Rev.* **51**: 477-497.
- Schreier, S., Frezzatti, W.A., Araujo, P.S., Chaimovich, H. und Cuccovia, I.M.** 1984. Effect of lipid membranes on the apparent pK of the local anesthetic tetracaine. Spin label and titration studies. *Biochim. Biophys. Acta* **769**: 231-237.
- Seddon, J.M. und Cevc, G.** 1993. *Phospholipid Handbook*, (Cevc, G., Ed.), Marcel Dekker, Inc., New York: 404-454.
- Seifert, K., Fendler, K. und Bamberg, E.** 1993. Charge transport by ion translocating membrane proteins on solid supported membranes. *Biophys. J.* **64**: 384-391.
- Shimooka, T., Shibata, A. und Terada, H.** 1992. The local anesthetic tetracaine destabilizes membrane structure by interaction with polar headgroups of phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* **1104**: 261-268.
- Skerra, A.** 1994. Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**: 131-135.
- Stallkamp, I., Dowhan, W., Altendorf, K. und Jung, K.** 1999. Negatively charged phospholipids influence the activity of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **172**: 295-302.
- Steverding, D., Thiel, C., Kadenbach, B., Capitanio, N. und Papa, S.** 1989. Influence of surface charge on the incorporation and orientation of cytochrome c oxidase in liposomes. *FEBS Lett.* **257**: 131-133.
- Strøm, A.R. und Kaasen, I.** 1993. Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. *Mol. Microbiol.* **8**: 205-210.

- Styrvold, O.B. und Strøm, A.R.** 1991. Synthesis, accumulation, and excretion of trehalose in osmotically stressed *Escherichia coli* K-12 strains: influence of amber suppressors and function of the periplasmic trehalase. *J. Bacteriol.* **173**: 1187-1192.
- Sutherland, L., Cairney, J., Elmore, M.J., Booth, I.R. und Higgins, C.F.** 1987. Osmotic regulation of transcription: induction of the *proU* betaine transport gene is dependent on accumulation of intracellular potassium. *J. Bacteriol.* **168**: 805-814.
- Sweeney, T.E. und Beuchat, C.A.** 1993. Limitations of methods of osmometry: measuring the osmolality of biological fluids. *Am. J. Physiol.* **264**: R469-R480.
- Towbin, H., Staehelin, T. und 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.
- Veld, G.I., Driessen, A.J. und Konings, W.N.** 1993. Bacterial solute transport proteins in their lipid environment. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 293-314.
- Verheul, A., Glaasker, E., Poolman, B. und Abee, T.** 1997. Betaine and L-carnitine transport in response to osmotic signals in *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Bacteriol.* **179**: 6979-6985.
- Verkman, A.S., van Hoek, A.N., Ma, T., Frigeri, A., Skach, W.R., Mitra, A., Tamarrappoo, B.K. und Farinas, J.** 1996. Water transport across mammalian cell membranes. *Am. J. Physiol.* **270**: C12-C30.
- Voss, S. und Skerra, A.** 1997. Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the *Strep-tag* II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.* **10**: 975-982.
- White, G.F., Racher, K.I., Lipski, A., Hallett, F.R. und Wood, J.M.** 2000. Physical properties of liposomes and proteoliposomes prepared from *Escherichia coli* polar lipids. *Biochim. Biophys. Acta* **1468**: 175-186.
- Wiggins, P.M.** 1990. Role of water in some biological processes. *Microbiol. Rev.* **54**: 432-449.
- Wolosker, H., Pacheco, A.G. und de Meis, L.** 1992. Local anesthetics induce fast Ca^{2+} efflux through a nonenergized state of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J. Biol. Chem.* **267**: 5785-5789.

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

Xiang, B., Taylor, J.C. und Markham, G.D. 1996. Monovalent cation activation and kinetic mechanism of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **271**: 1435-1440.

Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D. und Somero, G.N. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1222.

Zimmermann, J., Voss, H., Schwager, C., Stegemann, J., Erfle, H., Stucky, K., Kristensen, T. und Ansorge, W. 1990. A simplified protocol for fast plasmid DNA sequencing. *Nucl. Acids Res.* **18**: 105-109.

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer danke ich für das sehr ertragreiche Thema, das wahrscheinlich noch vielen Doktorandengenerationen zum Abschluss verhelfen wird, für die zahlreichen konstruktiven und kooperativen Diskussionen, die für den Erfolg der Arbeit unerlässlich waren, und für die Voraussetzungen, die das sehr gute Betriebsklima und die vielen Gedankenaustausche innerhalb der Arbeitsgruppe unterstützt haben.

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

Herzlich möchte ich mich bei Susanne Morbach für die sehr kollegiale Arbeitsgruppenleitung und für die vielen Anregungen und Ratschläge bedanken und dafür, dass sie jederzeit ein offenes Ohr für Fragen hatte.

Natürlich danke ich auch Andreas, Dirk, Hendrik, Martin, Oliver, Ralf und Udo für die gute Atmosphäre in der „Osmogruppe“ und für die Unterstützung und wertvollen Dialoge bei thematischen und persönlichen Fragen.

Den Laborkollegen aus allen vier Arbeitsgruppen danke ich für die kollegiale und freundschaftliche Stimmung in der Gruppe, die die drei Jahre kurzweilig werden ließen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Tina bedanken, die durch meinen Wechsel nach Köln auf vieles verzichten musste und mir dennoch Liebe und Kraft gegeben hat, mich nicht nur beruflich sondern auch persönlich zu entwickeln.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt habe, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und diejenigen 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. Diese Dissertation hat noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen; sie wurde – abgesehen von den unten aufgeführten Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht und eine solche Veröffentlichung wird vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vorgenommen werden.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation wurde von Professor Dr. R. Krämer betreut.

Datum:

Unterschrift:

Teilpublikationen

Rübenhagen, R., Rönsch, H., Jung, H., Krämer, R. und 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., Krämer, R. und Morbach, S. 2001. The osmoreactive betaine uptake carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* is a sensor for changes in cytoplasmic K⁺ related to osmstress. (eingesendet, EMBO)

Lebenslauf

14. Dezember 1971	Geboren in Bremen
September 1984 – Juni 1991	Gymnasium, KGS Stuhr-Brinkum, 28816 Stuhr
4. Juni 1991	Allgemeine Hochschulreife (Abitur)
August 1991 – Oktober 1992	Zivildienst, Schule an der Brakkämpe, 28259 Bremen
Oktober 1992 – Juni 1998	Biologiestudium (Diplom) an der Universität Osnabrück
September 1994 – Mai 1995	Akademisches Jahr an der Universität Leicester, England
18. Juni 1998	Studienabschluss als Diplom-Biologe
August 1998 – Juni 2001	Promotion (Biochemie) an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln, Institut für Biochemie, Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. R. Krämer