

**Vergleichende Studien zur Aktivitätsregulation
osmosensitiver Transporter aus
*Corynebacterium glutamicum***

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

Ralf Steger
aus Lingen

Köln, September 2002

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: 12. November 2002

Kurzzusammenfassung

Das Gram-positive Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum* ist mit vier osmotisch regulierten Transportern ausgestattet. Drei von ihnen, EctP, BetP und das in dieser Arbeit identifizierte und biochemisch charakterisierte LcoP-Protein, gehören zur Familie der Betain/Cholin/Carnitin- (BCCT) Transporter. Osmoregulierte Mitglieder dieser Familie besitzen cytoplasmatisch lokalisierte N- und C-terminale Domänen, die im Fall von BetP entscheidend an der Wahrnehmung und/oder Verarbeitung osmotischer Signale beteiligt sind. Unter Verwendung verkürzter Protein-Varianten und chimärer EctP/BetP-Proteine, welche durch den wechselseitigen Austausch der terminalen Domänen entstanden, wurden in dieser Studie die Funktionen der terminalen Domänen von EctP und BetP untersucht. Modifikationen im Bereich der N-terminalen Domäne erniedrigten die Sensitivität der Transporter gegenüber hyperosmotischen Bedingungen, während C-terminale Verkürzungen zum Verlust der sensorischen und regulatorischen Eigenschaften führten. Obwohl sich die Domänen signifikant in Länge und Nettoladung unterscheiden, besitzen sie sehr ähnliche regulatorische Funktionen, die für einen funktionell konservierten Regulationsmechanismus unter den Transportern der BCCT-Familie sprechen. Chimären, welche die N-terminale Domäne von EctP trugen, waren katalytisch aktiv. Die Osmoregulation der chimären Proteine ging jedoch in allen Fällen verloren. Trotz sehr ähnlicher Funktionen, können sich die C-terminalen Domänen der Transporter nicht funktionell ersetzen, während der beobachtete stärkere Einfluss der N-terminalen EctP-Domäne auf die Aktivierung der Chimären gut mit den Ergebnissen zur Regulation verkürzter Protein-Varianten übereinstimmt. Durch die Verwendung unterschiedlich geladener Lokalanästhetika wurde der Einfluss der Membrenumgebung auf die Osmoregulation von LcoP, EctP und BetP untersucht. Neben der Bestimmung des Wirkortes von Tetracain konnte gezeigt werden, dass nicht die Oberflächenladung der Membran, sondern eher die Membranfluidität und/oder Membranspannung die Aktivierung der Transporter moduliert. Die Aktivierung von BetP durch Tetracain war zudem unabhängig von der externen Osmolalität. In Kombination mit der beobachteten Kälteaktivierung von BetP weisen diese Befunde auf die Existenz eines zweiten Signal-Transduktionsweges hin.

Abstract

The Gram-positive soil bacterium *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four osmoresponsive carriers for the uptake of compatible solutes. Three of them, BetP, EctP and LcoP, latter identified and characterized in this study, belong to the betaine/choline/carnitine transporter (BCCT) family. Osmoregulated members of this family possess cytoplasmically located N- and C-terminal domains, which were shown to be involved in osmosensing and/or osmoregulation in the case of BetP. The function of cytoplasmically located terminal domains of EctP and BetP was investigated, using truncated mutants and chimeras constructed by domain swapping. Truncations of N-terminal domains decreased the sensitivity to hyperosmotic conditions, whereas truncation of C-terminal domains resulted in loss of osmosensing and osmoregulation ability. Although the domains differ in length and charge they were shown to have closely similar regulatory functions, arguing for a functionally conserved regulation mechanism for osmoresponsive carriers of the BCCT family. Chimeric proteins carrying the N-terminal domain of EctP were catalytically active but none of them showed a retained osmoresponsive regulation. Thus, in spite of functional similarity, the C-terminal extensions cannot replace each other in terms of osmoregulation whereas the observation of a stronger activating influence of the N-terminal domain of EctP is in agreement with the results obtained by the investigation of truncated mutants. By using differently charged local anesthetics the influence of the surrounding membrane on osmoregulation of LcoP, EctP and BetP was investigated. The results indicate that membrane fluidity and/or membrane strain modulate the activity regulation of the transporters. It was shown that tetracaine exerts its influence on activity regulation via the transmembrane part of the transporters and that the activation of BetP by tetracaine was independent of the external osmolality. These findings combined with the observed chill activation of BetP indicate the presence of a second pathway of signal transduction.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1	BAKTERIENSTÄMME UND PLASMIDE	11
2.2	NÄHRMEDIEN UND KULTIVIERUNGSBEDINGUNGEN	15
2.2.1	Nährmedien für <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i>	15
2.2.2	Medienzusätze	16
2.2.3	Kultivierungsbedingungen	16
2.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	16
2.3.1	Herstellung transformationskompetenter Zellen und Transformation.....	16
2.3.2	Konjugativer Plasmid-Transfer von <i>E. coli</i> nach <i>C. glutamicum</i>	17
2.3.3	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i>	18
2.3.4	Modifikationen von DNA.....	18
2.3.5	Polymerase-Kettenreaktion.....	18
2.3.5.1	Konstruktion verkürzter <i>ectP</i> - und <i>betP</i> -Mutanten.....	19
2.3.5.2	Konstruktion der <i>ectP/betP</i> Hybride.....	19
2.3.5.3	Konstruktion des <i>C. glutamicum</i> Deletionsstammes DHPF	20
2.3.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	20
2.3.7	DNA-Sequenzierung	20
2.4	ALLGEMEINE ANALYTISCHE METHODEN.....	21
2.4.1	Proteinbestimmungen.....	21
2.4.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	21
2.4.3	Western-Blot-Analyse.....	21
2.4.4	Bestimmung der Osmolalität.....	22
2.5	BIOCHEMISCHE METHODEN	22
2.5.1	Membranpräparation	22
2.5.2	Isolierung von <i>Strep-EctP</i> mit der <i>StrepTactin</i> [®] -Affinitätschromatographie ..	23
2.5.3	Isolierung von <i>GST-EctP</i> mittels Affinitätschromatographie	23
2.5.4	Synthese von [¹⁴ C]-Glycinbetain.....	24
2.5.5	Radiochemische Transportmessungen	25
2.5.5.1	Messungen der Glycinbetain-Aufnahme in <i>E. coli</i> MKH13 Zellen.....	25
2.5.5.2	Messungen der Glycinbetain-Aufnahme in <i>C. glutamicum</i> Zellen.....	26
2.5.6	CD-Spektroskopie der C-terminalen <i>EctP</i> -Domäne (<i>CEctP</i>)	26

3	ERGEBNISSE	28
3.1	IDENTIFIZIERUNG DES GLYCINBETAIN/ECTOIN-AUFNAHMESYSTEMS LcOP	28
3.1.1	<i>Isolierung des lcoP Gens.....</i>	29
3.1.2	<i>Biochemische Charakterisierung von LcoP nach Expression in C. glutamicum DHPF.....</i>	31
3.1.3	<i>Kinetische Parameter von LcoP in C. glutamicum DHPF</i>	32
3.1.4	<i>Physiologische Bedeutung von LcoP</i>	34
3.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR OSMOREGULATION VON ECTP	37
3.2.1	<i>Funktion verkürzter EctP- und BetP-Varianten in C. glutamicum DHPF</i>	37
3.2.2	<i>Affinität verkürzter EctP Varianten zu Natrium.....</i>	42
3.2.3	<i>Regulatorische Eigenschaften von EctP/BetP Chimären in C. glutamicum DHPF.....</i>	44
3.2.4	<i>Lokalanästhetika wirken am zentralen Bereich des EctP-Proteins</i>	49
3.2.5	<i>Einfluss unterschiedlich geladener amphiphiler Moleküle auf die Aktivität von EctP und BetP.....</i>	51
3.3	REINIGUNG VON ECTP NACH EXPRESSION IN E. COLI.....	54
3.3.1	<i>Heterologe Expression von strep-ectP in E. coli DH5α.....</i>	54
3.3.2	<i>Synthese und Reinigung von Strep-EctP</i>	54
3.3.3	<i>Heterologe Expression von gst-ectP in E. coli BL21</i>	56
3.3.4	<i>Synthese von GST-EctP.....</i>	56
3.4	STRUKTURELLE EIGENSCHAFTEN DER C-TERMINALEN DOMÄNE VON ECTP.....	58
3.4.1	<i>Heterologe Expression der C-terminalen EctP-Domäne in E. coli BL21.....</i>	59
3.4.2	<i>Synthese von GST-CEctP in E. coli BL21</i>	59
3.4.3	<i>Reinigung von GST-CEctP.....</i>	60
3.4.4	<i>CD-spektroskopische Untersuchung der C-terminalen EctP-Domäne.....</i>	62
4	DISKUSSION	64
4.1	DAS GLYCINBETAIN/ECTOIN-AUFNAHMESYSTEM LcOP	64
4.2	FUNKTIONEN DER TERMINALEN DOMÄNEN VON ECTP	67
4.3	EINFLUSS AMPHIPHILER SUBSTANZEN AUF BCCT TRANSPORTER	72
4.4	UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTUR DER C-TERMINALEN ECTP-DOMÄNE	75
5	ZUSAMMENFASSUNG	77
6	ANHANG 1: NUKLEOTID- UND ABGELEITETE AS-SEQUENZ VON LcOP. 79	79
7	LITERATUR.....	80

Abkürzungen

AHT	Anhydrotetracyclin
AP	Alkalische Phosphatase
Amp ^R	Resistenz gegen Ampicillin
ATCC	American type culture collection
BCCT-Familie	Betain-Cholin-Carnitin-Transporter-Familie
BCIP/NBT	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat / Nitro-Blau-Tetrazolium
BHI-Medium	Brain Heart Infusion-Medium
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Circularer Dichroismus
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dpm	<i>desintegration per minute</i> (Zerfälle pro Minute)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GB	Glycinbetain
GST	Glutathion-S-Transferase
HABA	4-Hydroxy-Azobenzon-2-Carboxylsäure
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kDa	Kilo-Dalton
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
KP _i	Kalium-Phosphat-Puffer
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
mosm	mmol/kg bzw. mosmol/kg
NG	Nassgewicht
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RBS	Ribosomenbindestelle
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat

Abkürzungen

<i>tetA</i>	Tetracyclin-Resistenzgen
TG	Trockengewicht
Tris	2-Amino-Hydroxymethylpropan-1,3-Diol
üN	Übernacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
V_{\max}	Maximalgeschwindigkeit

1 Einleitung

Osmotischer Stress

Nahezu alle Organismen sowohl Prokaryoten als auch Eukaryoten sind in ihren natürlichen Habitaten einer Vielzahl von wachstumsbegrenzenden Stressfaktoren ausgesetzt (Hecker *et al.*, 1996). Neben Änderungen des pH-Wertes, der Temperatur und des Nährstoffangebots haben Variationen der externen osmotischen Gegebenheiten einen entscheidenden Einfluss auf die Zellphysiologie und somit auf das Wachstum der Organismen. Hervorgerufen durch Regen oder intensive Sonneneinstrahlung sind besonders Mikroorganismen der oberen Bodenschichten, wie z.B. *Corynebacterium glutamicum* oder *Bacillus subtilis*, häufig stark schwankenden Osmolalitäten ausgesetzt, welche zu hypo- bzw. hyperosmotischem Stress führen (Miller & Wood, 1996).

Der Einfluss der externen Osmolalität auf eine Zelle ist auf die selektive Permeabilität der Cytoplasmamembran für unterschiedliche Moleküle zurückzuführen. Während Wasser durch die semipermeable Plasmamembran diffundieren kann, stellt sie für Makromoleküle und geladene Teilchen eine effektive Permeabilitätsbarriere dar (Bovell *et al.*, 1963). In der Regel ist die Konzentration an osmotisch wirksamen Soluten im Cytoplasma höher als im externen Medium. Aufgrund des resultierenden hohen osmotischen Potentials (Ψ_{π}) im Cytoplasma ist das Wasserpotential (Ψ_w), welches zum osmotischen Potential komplementär ist, sehr niedrig. Daher diffundieren Wassermoleküle vom externen Kompartiment mit höherem Wasserpotential ins Cytoplasma der Zelle und verursachen einen hydrostatischen Druck, auch Zellturgor genannt, der die Cytoplasmamembran gegen die Zellwand drückt und dem einströmenden Wasser entgegenwirkt. Der Wasserstrom kommt zum Erliegen sobald sich das Druckpotential des Zellturgors (Ψ_p) dem osmotischen Potential (Ψ_{π}) angeglichen hat. Dann gilt:

$$\Psi_w = \Psi_{\pi} + \Psi_p ; \text{ wenn } \Psi_{\pi} = \Psi_p \text{ dann } \Psi_w = 0$$

Das Druckpotential des Zellturgors (Ψ_p) entspricht dabei dem osmotischen Druck (Π), der wie folgt definiert ist:

$$\Pi = - (RT/V_w) \ln a_w$$

R = Gaskonstante; T = Temperatur in Kelvin; a_w = Wasseraktivität; V_w = partielles molares Volumen des Wassers

Die Summe der molaren Konzentrationen aller osmotisch wirksamen Teilchen (c_i) einer Lösung bezeichnet man als Osmolarität [osM]. Diese beschreibt den osmotischen Druck wie folgt:

$$\text{Osmolarität} = \sum_i c_i \approx \Pi / RT$$

Da die Summe der osmotisch wirksamen Teilchen in einer Lösung berechnet, jedoch nicht gemessen werden kann, wird in der Praxis der osmotische Druck in Abhängigkeit vom Gewicht der Teilchen in einer Lösung (Osmolalität) bestimmt. Hierbei wird die durch gelöste Teilchen hervorgerufene Gefrierpunktniedrigung einer Lösung gemessen.

$$\text{Osmolalität} = \Pi / RT$$

Sowohl Bakterien- als auch Pflanzenzellen sind auf die Aufrechterhaltung ihres Zellurgors in engen physiologischen Grenzen angewiesen, da die auftretenden mechanischen Kräfte vermutlich essentiell für die Teilung und das Wachstum der Zellen sind (Koch, 1983). Daher haben die Organismen im Laufe der Evolution effektive Mechanismen entwickelt, um unter wechselnden osmotischen Bedingungen einen konstanten Turgordruck beizubehalten. Unter hyperosmotischen Bedingungen (Erhöhung der externen Osmolalität) werden osmotisch wirksame Substanzen im Cytoplasma akkumuliert, das osmotische Potential steigt und ein Ausstrom von Wasser wird verhindert. Unter hypoosmotischen Bedingungen hingegen (Erniedrigung der externen Osmolalität) werden osmotisch wirksame Solute aus der Zelle entlassen, abgebaut oder zu osmotisch weniger wirksamen Molekülen verstoffwechselt. Das osmotische Potential des Cytoplasmas sinkt und ein weiterer Wassereinstrom wird verhindert.

Diese Adaptation an unterschiedlichste osmotische Gegebenheiten wird auch als Osmoregulation bezeichnet (Brown *et al.*, 1986). Die essentielle Bedeutung der Osmoregulation für Zellen zeigt sich in der nahezu ubiquitären Verbreitung von molekularen Mechanismen zum Schutz vor osmotischem Stress.

Osmoregulation unter hypoosmotischen Bedingungen

Bei plötzlich auftretenden hypoosmotischen Bedingungen (hyperosmotischer Schock) nimmt die Osmolalität des externen Medium schlagartig ab. Aufgrund des erhöhten Konzentrationsgefälles zwischen dem Cytoplasma einer Bakterienzelle und dem Medium kommt es zu einem Wassereinstrom in das Cytoplasma. Der Turgordruck steigt massiv an und die Zelle droht zu platzen. Um diesem Szenario entgegenzuwirken muss das Bakterium das osmotische Potential des Cytoplasmas rasch reduzieren. Eine weit verbreitete Strategie hierzu ist die Freisetzung von Ionen und osmotisch wirksamen Substanzen durch die Aktivierung mechanosensitiver Kanäle (Msc) (Schleyer *et al.*, 1993). Durch elektrophysiologische Untersuchungen konnten mechanosensitive Kanäle sowohl in Eu- als auch in Prokaryoten nachgewiesen werden (Morris, 1990; Sackin, 1995).

Das Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* besitzt mindestens drei mechanosensitive Kanäle (MscL, MscS und MscM), die sich hinsichtlich ihrer Aktivierungsschwellen und Leitfähigkeiten deutlich voneinander unterscheiden (Berrier *et al.*, 1996). Die Öffnung der Kanäle erfolgt aufgrund des steigenden Turgordrucks und ist essentiell für die Anpassung an einen hypoosmotischen Schock (Levina *et al.*, 1999). Auch bei den Gram-positiven Bakterien *Lactobacillus plantarum* (Glaasker *et al.*, 1996), *B. subtilis* (Moe *et al.*, 1998), *C. glutamicum* (Ruffert *et al.*, 1999; Nottebrock, 2000) und *Mycobacterium tuberculosis* (Sukarev *et al.*, 2001) wurden mechanosensitive Kanäle identifiziert, die große Ähnlichkeiten zu MscL und MscS aus *E. coli* zeigen. Die funktionelle Charakterisierung von MscL und MscS aus *C. glutamicum* zeigte, dass diese Kanäle dem spezifischen Efflux von Glycinbetain, Prolin sowie einem geringen Efflux von Kationen dienen (Ruffert *et al.*, 1999; Nottebrock, 2000). Daneben besitzt dieses Bakterium einen weiteren mechanosensitiven Kanal dessen Spezifität jedoch noch nicht geklärt ist (Nottebrock, 2000). Die Aufklärung der 3D-Struktur von MscL aus *M. tuberculosis* ermöglichte erste detaillierte Einblicke in die Funktionsweise mechanosensitiver Kanäle. Ein aktuell diskutiertes Modell zur Aktivierung von MscL besagt, dass es unter hypoosmotischen Bedingungen, in Folge des steigenden Turgordrucks, zu einer lateralen Expansion der Cytoplasmamembran kommt. Der Druck der Doppellipidschicht auf

den als Pentamer vorliegenden Kanal lässt nach, die Kanalpore weitet sich, ist jedoch weiterhin geschlossen. Erst in einem zweiten Schritt ermöglicht die laterale Expansion weiterer Proteinbereiche eine Öffnung des Kanals (Sukarev *et al.*, 2001).

Neben mechanosensitiven Kanälen wurden bei Tieren, Pflanzen und einigen Gram-negativen Bakterienspezies Wasserkanäle, die sogenannten Aquaporine, entdeckt (Hohmann *et al.*, 2000; Agre *et al.*, 1993; Calamita *et al.*, 1995). Untersuchungen an AqpZ aus *E. coli* zeigten, dass dieser Kanal nicht essentiell für das Überleben der Zellen unter wechselnden osmotischen Bedingungen ist (Delamarche *et al.*, 1999). Er ermöglicht jedoch unter hypo- und hyperosmotischen Bedingungen eine erleichterte Diffusion von Wasser über die Cytoplasmamembran und demzufolge eine schnellere osmotische Adaptation. Unter den Gram-positiven Bakterien beschränkt sich die Identifizierung von Aquaporinen bislang auf *Enterococcus faecalis*.

Osmoregulation unter hyperosmotischen Bedingungen

Steigt die Osmolalität des externen Mediums, sinkt dessen Wasserpotential und Wassermoleküle diffundieren entlang des osmotischen Gradienten aus der Zelle. Der Zellturgor sinkt und den cytoplasmatischen Proteinen wird ihre funktionsrelevante Hydrathülle entzogen. Als Folge dieser Dehydratation kommen Zellstoffwechsel und Zellteilung zum Erliegen (Wood, 1999). Um dieses zu verhindern haben Mikroorganismen im Laufe der Evolution zwei fundamental unterschiedliche Strategien entwickelt.

Ein überwiegender Teil der Prokaryoten und Archaea saliner Ökosysteme, wie sie z.B. Salzseen darstellen, bevorzugen die sogenannte „Salt-in“- Strategie (Galinski und Trüper, 1994). Diese Organismen akkumulieren Kalium in molaren Konzentrationen um einer Dehydratation des Cytoplasmas vorzubeugen. Da der gesamte Zellstoffwechsel und die beteiligten Proteine an die hypersalinen Lebensbedingungen angepasst wurden, ist diesen Organismen ein Überleben unter gemäßigten osmotischen Gegebenheiten nicht mehr möglich (Britton *et al.*, 1998; Elcock *et al.*, 1998). Viele halophile Mikroorganismen sind zudem in der Lage osmotisch wirksame Substanzen zu synthetisieren, um das osmotische Potential ihres Cytoplasmas zu erhöhen (Galinski, 1995; Ventosa *et al.*, 1998).

Ökosysteme halotoleranter Mikroorganismen sind häufig durch plötzliche Fluktuationen in ihren Osmolalitäten gekennzeichnet. Die Bewohner solcher Habitats sind daher auf eine deutlich flexiblere Form der Anpassung angewiesen. Sie verfolgen in der Regel die sogenannte „Salt-out“-Strategie, bei der sich eine Anpassung der gesamten Zellphysiologie an hohe Salzkonzentrationen erübrigt. Die Adaptation an hyperosmotische Gegebenheiten

verläuft dabei in mehreren Phasen. Als unmittelbare, zeitlich begrenzte Reaktion auf einen hyperosmotischen Schock akkumulieren Bakterien wie *E. coli*, *B. subtilis* und *C. glutamicum* Kaliumionen im Cytoplasma (Dinnbier *et al.*, 1988; McLaggan *et al.*, 1994; Whatmore *et al.*, 1990; Burger, 2001). Da eine hohe cytoplasmatische Ionenstärke den Zellstoffwechsel aller nicht-halophilen Bakterien beeinträchtigt, entlässt *E. coli* zusätzlich positiv geladene Teilchen wie Protonen und Putrescin aus dem Cytoplasma und die Synthese des Gegenions Glutamat wird induziert (McLaggan *et al.*, 1994). Während bei *B. subtilis* und *C. glutamicum* detaillierte Erkenntnisse über den Mechanismus der Kaliumakkumulation fehlen, konnten bei *E. coli* vier involvierte Aufnahmesysteme (TrkG, TrkH, Kdp, Kup) identifiziert und charakterisiert werden (Bakker, 1993; Silver, 1996; Stumpe *et al.*, 1996). Im weiteren Verlauf der Stressantwort halotoleranter Bakterien wird Kalium durch Synthese und/oder Aufnahme sogenannter kompatibler Solute ersetzt. Diese organischen, osmoprotektiven Substanzen bieten den Vorteil, dass sie selbst in molaren cytoplasmatischen Konzentrationen den zellulären Stoffwechsel nicht beeinflussen und eine stabilisierende Wirkung auf die native Konformation von Enzymen zeigen (Yancey *et al.*, 1982; Wood, 1999). Zu ihnen gehören z.B. die in Abbildung 1 dargestellten Substanzen Glycinbetain, Prolin und Ectoin.

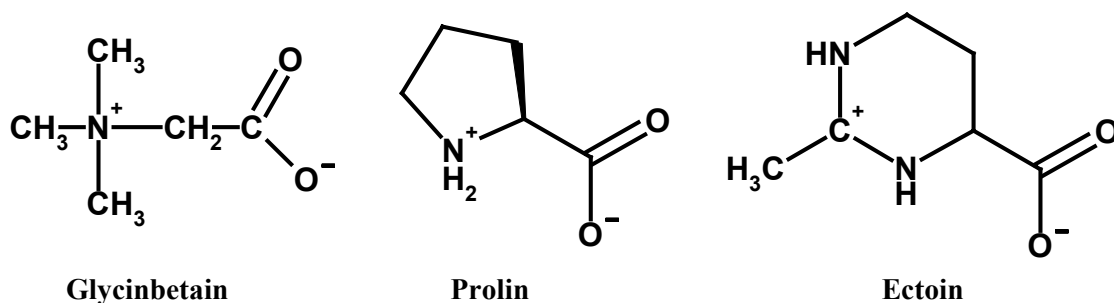


Abb. 1: Strukturformeln einiger weitverbreiteter kompatibler Solute

Eine mögliche Erklärung für die Wirkung kompatibler Solute auf die Proteinstabilität bietet das Modell des präferentiellen Ausschlusses (Abbildung 2). Dieses besagt, dass kompatible Solute vorzugsweise von einer Wechselwirkung mit der Hydrathülle von Proteinen ausgeschlossen sind. Vielmehr ordnen sie sich um die Proteine herum an und bewirken dadurch eine Erhöhung der lokalen Wasserkonzentration an der Proteinoberfläche. Der präferentielle Ausschluss ist energetisch am günstigsten, wenn die Oberfläche eines Proteins

möglichst klein ist, was letztlich die Stabilisierung eines Proteins in einer kompakten, nativen Konformation zur Folge hat (Potts, 1994).

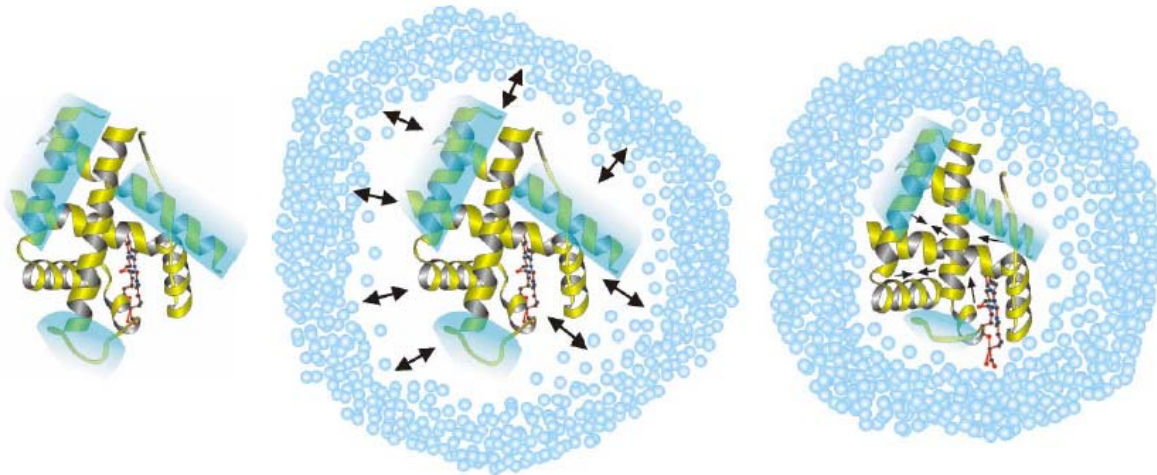


Abb. 2: Modell des präferentiellen Ausschlusses („preferential exclusion“). Die kompatiblen Solute (graue Kugeln) sind von der Hydrathülle des Proteins ausgeschlossen. Das Protein liegt in kompakter, nativer Konformation vor. (Abbildung, Fa. Merck)

Akkumulation kompatibler Solute durch endogene Synthese

Bei halotoleranten Prokaryoten geht eine langfristige Adaptation an hyperosmotische Bedingungen in der Regel mit der Synthese kompatibler Solute einher, wobei das Spektrum der Syntheseleistungen von der jeweiligen enzymatischen Ausstattung der Organismen abhängt. Weitverbreitet ist neben der osmotisch induzierten *de novo* Synthese von Prolin, die man bei Gram-positiven Prokaryoten wie *C. glutamicum* oder *B. subtilis* nachgewiesen hat (Rönsch, 2000; Whatmore *et al.*, 1990), die Synthese von Trehalose, welche beispielsweise *E. coli* und *C. glutamicum* eine Adaptation an längerfristige hyperosmotische Bedingungen ermöglicht (Rönsch, 2000; Wood *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu *C. glutamicum* besitzen *E. coli* und *B. subtilis* zudem die Fähigkeit extern verfügbares Cholin, das durch den Abbau Cholin-haltiger Phospholipide entsteht, aufzunehmen und enzymatisch zu Glycinbetain zu oxidieren (Lamark *et al.*, 1991; Kappes *et al.*, 1999). Neben einer Regulation der Biosynthese-Enzyme auf Aktivitätsebene konnte bei verschiedenen Mikroorganismen auch eine Expressionsregulation der kodierenden Gene nachgewiesen werden (Killham und Firestone, 1984; Galinski und Trüper, 1994).

Aufnahme kompatibler Solute

Auch bei einem hyperosmotischen Schock kommt es zu einer gesteigerten Synthese kompatibler Solute. Bei externer Verfügbarkeit natürlich vorkommender Schutzsubstanzen, wie z.B. Prolin oder Glycinbetain, wird jedoch deren schnellere und zudem energetisch günstigere Aufnahme gegenüber der Eigensynthese bevorzugt. Die Synthese und der Eintrag dieser Osmoprotektiva in die Umwelt erfolgt im allgemeinen durch Pflanzen, Tiere und Microorganismen (Kemble und McPherson, 1954). Die Aufnahme ins Cytoplasma der Bakterienzellen wird durch osmotisch regulierte Transportsysteme katalysiert, welche sich aus den verschiedensten Protein-Familien rekrutieren. Neben Bindeprotein-abhängigen ABC-Transportern wie ProU aus *E. coli* (Grothe *et al.*, 1986), OpuA/B/C aus *B. subtilis* (Kappes *et al.*, 1998 und 1999) oder OpuA aus *Lactococcus lactis* (Van der Heide und Poolman, 2000) und Bindeprotein-abhängigen sekundären Transportern wie TeaABC aus *Halomonas elongata* (Grammann *et al.*, 2002) wurden zahlreiche Natrium-Symporter wie EctP und BetP aus *C. glutamicum* (Farwick *et al.*, 1995; Peter *et al.* 1998b), bzw. Protonen-Symporter wie ProP aus *E. coli* (Sutherland *et al.*, 1987) identifiziert. Zudem besitzt ein Bakterium meist mehrere Transportsysteme mit unterschiedlichen Substrataffinitäten und Substratspektren, wodurch eine rasche und flexible Adaptation der Zellen an plötzlich auftretende hyperosmotische Bedingungen gewährleistet wird (May *et al.*, 1986; Millner *et al.*, 1988; Wood, 1988). Exemplarisch hierfür seien *C. glutamicum* und *B. subtilis* genannt, wobei letzteres auf insgesamt fünf osmotisch regulierte Transporter zurückgreifen kann, welche die Aufnahme von mehr als zehn unterschiedlichen kompatiblen Solute katalysieren (Kempf und Bremer, 1995; Kappes und Bremer, 1998). *C. glutamicum* besitzt ausschließlich sekundäre Transporter für die osmotisch regulierte Aufnahme kompatibler Solute (Abbildung 3). Die Aufnahme von Prolin nach einem hyperosmotischen Schock erfolgt vermutlich hauptsächlich durch die Prolin/Ectoin-spezifische Permease ProP aus der MFS-Familie (major facilitator superfamily) (Peter *et al.*, 1998b). Diese ist nah verwandt mit dem gleichnamigen Protein aus *E. coli*, welches derzeit zu den am besten untersuchten osmotisch regulierten Transportsystemen unter den Prokaryoten gehört (Grothe *et al.*, 1986; Culham *et al.*, 2000). Die Aufnahme von Glycinbetain, dem bevorzugten kompatiblen Solut von *C. glutamicum*, erfolgt durch die beiden nah verwandten sekundären Natrium-Symporter BetP und EctP, zwei Mitgliedern der sogenannten BCCT-Familie (Betain/Carnitin/Cholin-Transporter; Saier *et al.*, 1999). Während das Glycinbetain-spezifische BetP-Protein sowohl auf der Expressions- als auch auf der Aktivitätsebene osmotisch reguliert ist, besagen Transportmessungen, dass die Regulation des Ectoin/Glycinbetain/Prolin-spezifischen

Transportproteins EctP im Wesentlichen auf der Aktivitätsebene erfolgt (Farwick *et al.*, 1995; Peter *et al.*, 1996; Peter *et al.*, 1998b).

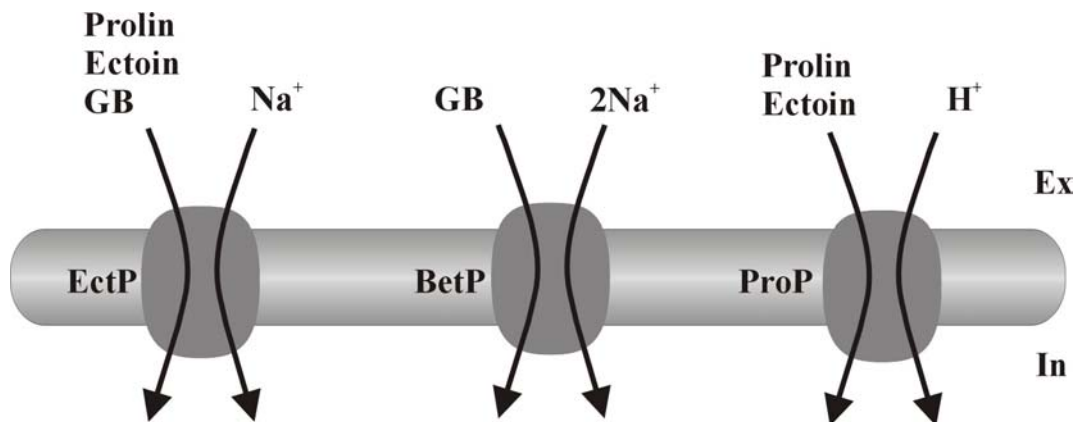


Abb. 3: Osmotisch regulierte Transportproteine in *C. glutamicum*. Hyperosmotische Bedingungen aktivieren die abgebildeten sekundären Transporter EctP, BetP und ProP. Die Substratspezifitäten und das Co-Substrat sind angegeben. (GB): Glycinbetain

Wahrnehmung von osmotischem Stress

Während zahlreiche Transportsysteme für kompatible Solute biochemisch detailliert charakterisiert wurden, ist über die Natur des osmotischen Signals (bzw. der Signale) und dessen Wahrnehmung meist wenig bekannt. BetP aus *C. glutamicum* zählt neben ProP, dem Protonen-Symporter aus *E. coli* und OpuA, dem ABC-Transporter aus *L. lactis* zu den am besten untersuchten osmotisch regulierten Transportern. Detaillierte *in vivo* und *in vitro* Studien zeigten, dass diese drei Proteine neben ihrer katalytischen Funktion, dem Transport von kompatiblen Soluten, zwei weitere Funktionen beinhalten, eine sensorische Funktion (Wahrnehmung eines osmotischen Reizes) und eine regulatorische Funktion (Anpassung der Transportaktivität an die externen osmotischen Gegebenheiten) (Peter *et al.*, 1998a; Racher *et al.*, 1999; Van der Heide und Poolman, 2000; Rübenhagen *et al.*, 2000). Unabhängige Untersuchungen dieser und anderer Transporter bezüglich ihrer Reaktionen auf hyperosmotischen Stress entfachten eine Diskussion über die Wahrnehmung putativer osmotischer Reize, wie z.B. (i) sinkender Zellturgor, (ii) Veränderungen der externen Ionenstärke, (iii) transmembrane osmotische Gradienten, (iv) Veränderungen in der Membranspannung, (v) „molecular crowding“ oder (vi) direkte Effekte veränderter Osmolalitäten auf die Proteinstrukturen, welche zur Aktivierung der katalytischen Aktivität osmotisch regulierter Aufnahmesysteme führen könnten (Csonka und Hanson, 1991; Poolman und Glaasker, 1998; Wood, 1999; Morbach und Krämer, 2002). Durch die Verwendung des

Proteoliposomensystems, welches eine isolierte Untersuchung der oben genannten Reize ermöglicht, konnte der Turgordruck als osmotischer Reiz ausgeschlossen werden, da dieser im genannten System aufgrund der fehlenden Zellwand nicht auftritt. Vielmehr konnte für BetP kürzlich eine erhöhte interne Kaliumkonzentration als wichtiger osmotischer Reiz identifiziert werden (Rübenhagen *et al.*, 2001). Identische Studien enthüllten die interne Ionenstärke als molekularen Auslöser der OpuA-Aktivierung (Van der Heide und Poolman, 2001). Das Proteoliposomensystem erlaubte ebenfalls Studien zum Einfluss der Membranumgebung auf die Aktivierung von BetP und OpuA. Durch die Verwendung des Lokalanästhetikums Tetracain konnte gezeigt werden, dass die Schwellenwerte für die Aktivierung beider Transportsysteme signifikant durch die Membranzusammensetzung und den physikalischen Zustand der Phospholipid-Doppelschicht beeinflusst wird (Rübenhagen *et al.*, 2000; Van der Heide und Poolman, 2001).

Wie alle osmotisch regulierten Mitglieder der BCCT-Familie besitzen BetP und EctP laut Sekundärstrukturvorhersagen zwölf Transmembransegmente und geladene, cytoplasmatisch lokalisierte, terminale Bereiche. Während die Transmembranbereiche der Transporter signifikante Sequenzidentitäten besitzen, unterscheiden sich die terminalen Domänen sowohl in der Aminosäurezusammensetzung als auch in ihrer Länge und Nettoladung deutlich voneinander. Erste Hinweise bezüglich der Wahrnehmung eines osmotischen Reizes durch osmotisch regulierte sekundäre Transporter gehen auf die Verwendung von stufenweise verkürzten BetP-Proteinen zurück (Peter *et al.*, 1998a). Es konnte gezeigt werden, dass N- und C-terminal verkürzte BetP-Protein-Varianten nach einem hyperosmotischen Schock charakteristisch veränderte Regulationsmuster aufweisen. Somit scheinen interessanterweise gerade die terminalen, nicht konservierten Proteinbereiche eine entscheidende Rolle bei der Wahrnehmung eines osmotischen Signals und dessen Weiterleitung an den katalytischen Bereich von BetP zu spielen. Weitere interessante Befunde bezüglich der Aktivitätsregulation von BetP lieferten spektroskopische Untersuchungen an der heterolog synthetisierten C-terminalen Domäne des Proteins. Es konnte gezeigt werden, dass diese in wässriger Lösung weitgehend entfaltet vorliegt, durch Wechselwirkung mit hydrophoben Oberflächen jedoch in eine α -helikale Struktur übergeht (Burger, 2001). In Anwesenheit hoher Kaliumkonzentrationen wird diese Wechselwirkung unterbunden. Daher wurde postuliert, dass der C-Terminus von BetP unter physiologischen Bedingungen mit der Zellmembran interagiert und dadurch den Transporter in einer inaktiven Konformation hält. Ein Anstieg der internen Kaliumkonzentration, wie er nach einem hyperosmotischen Schock auftritt, soll zum Ablösen der Domäne von der Zellmembran führen und dadurch BetP aktivieren.

Ziel der Arbeit

Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte im Verständnis osmotisch regulierter Transporter zu verzeichnen sind, ist man noch weit von einem detaillierten Verständnis der Signalwahrnehmung und der proteinintrinsischen Signaltransduktion entfernt. Osmotisch regulierte, Natrium-gekoppelte sekundäre Transporter der BCCT-Proteinfamilie sind im Reich der Prokaryoten weit verbreitet. Neben den bereits genannten wurden in den letzten Jahren zahlreiche Proteine dieser Familie in den unterschiedlichsten Organismen beschrieben und charakterisiert, so z.B. der Cholin-Transporter CudT und aus *Staphylococcus xylosus*, (Rosenstein *et al.*, 1999), das Glycinbetain-Transportsystem BetL aus *Listeria monocytogenes* (Sleator *et al.*, 1999) oder der Glycinbetain/Prolinbetain Transporter BetS aus *Sinorhizobium meliloti* (Boscari *et al.*, 2002). BCCT-Transporter scheinen somit generell eine große Bedeutung bei der Adaptation an hyperosmotische Bedingungen zu besitzen.

Diese Arbeit beschäftigt sich daher mit der Frage, ob es sich bei der Wahrnehmung eines osmotischen Signals durch Mitglieder dieser Proteinfamilie um proteinspezifische oder funktionell konservierte Mechanismen handelt. Das biotechnologisch bedeutsame Bakterium *C. glutamicum* bietet sich für eine derartige Studie besonders an, weil es mit EctP, neben dem bereits detailliert untersuchten BetP-Transporter, mindestens ein weiteres Protein der gleichen Protein-Familie besitzt. Durch biochemische Studien mit verkürzten Protein-Varianten sollte der Mechanismus der osmotischen Reizwahrnehmung und die Aktivitätsregulation von EctP aufgeklärt werden. Hierzu sollten die gewünschten Protein-Varianten durch molekularbiologische Methoden hergestellt und nach Konstruktion eines geeigneten *C. glutamicum* Stammes biochemisch charakterisiert werden. Nach Identifizierung der sensorischen Domäne(n), sollte die Möglichkeit einer funktionelle Komplementierbarkeit dieser Proteinbereiche durch wechselseitigen Austausch gegen die entsprechenden BetP-Domänen untersucht werden. Durch die Verwendung von Lokalanästhetika sollte der Einfluss der Membranumgebung auf die Aktivitätsregulation von BCCT-Proteinen untersucht werden. Des Weiteren wurde eine Reinigung von EctP, bzw. der regulatorischen Domänen von EctP, angestrebt, um durch *in vitro* Studien Hinweise auf funktionsrelevante und strukturelle Eigenschaften des Proteins zu erhalten. Diese stellen eine unabdingbare Voraussetzung zum Verständnis der molekularen Mechanismen der osmotischen Reizwahrnehmung dar.

2 Material und Methoden

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

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*- und *C. glutamicum*-Stämme sowie deren Eigenschaften sind in Tabelle 1, die verwendeten Plasmide in Tabelle 2 und die zur Klonierung bzw. Sequenzierung verwendete Oligodesoxynukleotide in den Tabellen 3 und 4 aufgeführt.

Tabelle 1: Eigenschaften der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp, Charakteristika	Referenz
<i>C. glutamicum</i>		
ATCC 13032	Wildtyp	Abe <i>et al.</i> , 1967
DHPE	ATCC 13032 ($\Delta betP$, $\Delta proP$, $\Delta putP$, $\Delta ectP$)	Peter <i>et al.</i> , 1996
DHPF	ATCC 13032 ($\Delta betP$, $\Delta proP$, $\Delta putP$, $\Delta ectP$, $\Delta lcoP$)	diese Arbeit
R127	<i>res</i>	Liebl <i>et al.</i> , 1989
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>endA1 supE44 thi-1λ recA1 gyrA96 relA1 deoR $\Delta(lacZYA-argF)$</i> <i>U169 Φ80dlacZΔM15 mcrA $\Delta(mrr hsdRMS mcrBC)$</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
JM109	F' <i>traD36 lac^f $\Delta(lacZ)$M15 proA B / e14</i> (McrA ⁻) $\Delta(lac-proAB)$ <i>thi-1 gyrA96 (N_x^R) endA1 hsdR17 (r_{km}⁻) relA1 supE44 recA1</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
MKH13	<i>araD39 (argF-lac) U169 relA51 rps150 flbB5301 deoC ptsF25</i> $\Delta(putPA)101 \Delta(proP)2 \Delta(proU)$	Kempf & Bremer, 1995
S17-1	<i>thi-1F endA1 hsdR17 supE44 λ pro</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
BL21	<i>HsdS gal (λIts857 ind1 Sam7 nin5 lac UV5-T7 gene 1)</i>	Studier & Moffatt, 1986

Tabelle 2: Eigenschaften der verwendeten Plasmide

Plasmide	Marker/Eigenschaft	Referenz
pK19 <i>mobsacB</i>	Km ^R , <i>ori</i> pUC, <i>mob</i> , <i>sacB</i>	Pühler <i>et al.</i> , 1994
pUC18/19	ColE1 <i>ori</i> , Amp ^R	Vieira <i>et al.</i> , 1982
pEKEX2	<i>lacI^f</i> , <i>ptac</i> , <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Pendel-Vektor	Eikmanns <i>et al.</i> , 1991
pASK-IBA5	Amp ^R , Expressionsvektor	Skerra, 1994
pASK-IBA5- <i>ectP</i>	pASK-IBA3, <i>ectP</i> mit Sequenz für N-term. Strep-Taq	diese Arbeit
pUC18 <i>lcoP</i> chrom	pUC18, 2,5 kb <i>lcoP</i> -Fragment mit flankierenden DNA Bereichen	diese Arbeit
pUC18Δ <i>lcoP</i> chrom	pUC18 <i>lcoP</i> chrom, mit deletiertem <i>NruI/NcoI</i> -Fragment	diese Arbeit
pUC18 <i>lcoP</i>	pUC18 mit <i>lcoP</i> Sequenz in <i>BamHI/EcoRI</i> -Schnittstelle	diese Arbeit
pK19 <i>lcoP</i>	pK19 <i>mobsacB</i> mit <i>lcoP</i> Sequenz	diese Arbeit
pGEX3	Amp ^R , <i>lacI^f</i> , <i>gst</i> , Expressionsvektor	Smith & Johnson, 1988
pGEXCEctP	pGEX3, kodierende Sequenz für C-Terminus von EctP, 324 bp	diese Arbeit
pGEXEctP	pGEX3, <i>ectP</i>	diese Arbeit
pGEXBetP	pGEX3, <i>betP</i>	diese Arbeit
pUC19 <i>ectP</i>	pUC19 mit <i>ectP</i> Sequenz in <i>BamHI/EcoRI</i> -Schnittstelle	diese Arbeit
pUC18 <i>betP</i>	pUC18 mit <i>betP</i> Sequenz in <i>BamHI</i> -Schnittstelle	diese Arbeit
pUC18 <i>mbetp</i>	pUC18 <i>betP</i> , inserierte <i>SnaBI/ScaI</i> Restriktionsschnittstellen	diese Arbeit
pUC18 <i>betpNE</i> ,	pUC18 <i>betP</i> mit kodierender Sequenz für EctP N-Terminus	diese Arbeit
pUC18 <i>betpCE</i>	pUC18 <i>betP</i> mit kodierender Sequenz für EctP C-Terminus	diese Arbeit
pUC18 <i>betpNCE</i>	pUC18 <i>betP</i> mit kodierender Sequenz für EctP N/C-Termini	diese Arbeit
pUC19 <i>mectP</i>	pUC19 <i>ectP</i> , inserierte <i>SnaBI/ScaI</i> Restriktionsschnittstellen	diese Arbeit
pUC19 <i>ectpNB</i>	pUC19 <i>ectP</i> mit kodierender Sequenz für BetP N-Terminus	diese Arbeit
pUC19 <i>ectpCB</i>	pUC19 <i>ectP</i> mit kodierender Sequenz für BetP C-Terminus	diese Arbeit
pUC19 <i>ectpNCB</i>	pUC19 <i>ectP</i> mit kodierender Sequenz für BetP N/C-Termini	diese Arbeit
pUC19 <i>ectPCA12</i>	pUC19, <i>ectP</i> -Sequenz, PCR 1833 bp	diese Arbeit
pUC19 <i>ectPCA30</i>	pUC19, <i>ectP</i> -Sequenz, PCR 1779 bp	diese Arbeit
pUC19 <i>ectPCA53</i>	pUC19, <i>ectP</i> -Sequenz, PCR 1710 bp	diese Arbeit
pUC19 <i>ectPCA60</i>	pUC19, <i>ectP</i> -Sequenz, PCR 1689 bp	diese Arbeit
pUC19 <i>ectPNΔ106</i>	pUC19, <i>ectP</i> -Sequenz, PCR 1551 bp	diese Arbeit
pUC19 <i>ectPNΔ23</i>	pUC19, <i>ectP</i> -Sequenz, PCR 1800 bp	diese Arbeit
pEctP	pEKEX2, <i>ectP</i> -Sequenz, 1869 bp	diese Arbeit
pEctPCA12	pEKEX2, <i>ectP</i> -Sequenz, 1833 bp	diese Arbeit
pEctPCA30	pEKEX2, <i>ectP</i> -Sequenz, 1779 bp	diese Arbeit
pEctPCA53	pEKEX2, <i>ectP</i> -Sequenz, 1710 bp	diese Arbeit
pEctPCA106	pEKEX2, <i>ectP</i> -Sequenz, 1551 bp	diese Arbeit
pEctPNΔ23	pEKEX2, <i>ectP</i> -Sequenz, 1800 bp	diese Arbeit
pEctPNΔ23CΔ30	pEKEX2, <i>ectP</i> -Sequenz, 1620 bp	diese Arbeit

Plasmide	Marker/Eigenschaft	Referenz
pEctPN Δ 23C Δ 106	pEKEX2, <i>ectP</i> -Sequenz, 1482 bp	diese Arbeit
pBetP	pEKEX2, <i>betP</i> -Sequenz 1785 bp	diese Arbeit
pUC19 <i>betPC</i> Δ 45	pUC19, <i>betP</i> -Sequenz, PCR 1650 bp	diese Arbeit
pBetPC Δ 45	pEKEX2, <i>betP</i> -Sequenz 1650 bp	diese Arbeit
pBetPN0 (N Δ 60)	pEKEX2, <i>betP</i> -Sequenz 1608 bp	Peter <i>et al.</i> , 1998
pmEctP	pEKEX2, <i>ectP</i> mit <i>Sna</i> BI/ <i>Sca</i> I Restriktionsschnittstellen	diese Arbeit
pmBetP	pEKEX2, <i>betP</i> mit <i>Sna</i> BI/ <i>Sca</i> I Restriktionsschnittstellen	diese Arbeit
pEctPNB	pEKEX2, <i>ectP</i> , kodierende Sequenz für BetP N-Terminus	diese Arbeit
pEctPCB	pEKEX2, <i>ectP</i> , kodierende Sequenz für BetP C-Terminus	diese Arbeit
pEctPNCB	pEKEX2, <i>ectP</i> , kodierende Sequenz für BetP N/C-Termini	diese Arbeit
pBetPNE	pEKEX2, <i>betP</i> , kodierende Sequenz für EctP N-Terminus	diese Arbeit
pBetPCE	pEKEX2, <i>betP</i> , kodierende Sequenz für EctP C-Terminus	diese Arbeit
pBetPNCE	pEKEX2, <i>betP</i> , kodierende Sequenz für EctP N/C-Termini	diese Arbeit
pEctPNBN Δ 37	pEctPNbet, Deletion von 37 AS am N-Terminus	diese Arbeit
pEctPNBC Δ 106	pEctPNbet, Deletion von 106 AS am C-Terminus	diese Arbeit
pBetPNEC Δ 45	pBetPNect, Deletion von 45 AS am C-Terminus	diese Arbeit
pBetPCEC Δ 30	pBetPCect, Deletion von 30 AS am C-Terminus	diese Arbeit
pBetPCEC Δ 53	pBetPCect, Deletion von 53 AS am C-Terminus	diese Arbeit

Tab. 3: Zur Klonierung verwendete synthetische Oligodesoxynukleotide

Konstrukt	Primer	Ausgangs-plasmid	Sequenz 5'-3'
EctPWT	EctP-N0	pUC19 <i>ectP</i>	GGATCCATGAGCTCAAATATAGCTATC
	EctP-C0		GAATTCAATATCGTATTCGTCCCTGGAC
EctPC Δ 12	EctP-N0	pUC19 <i>ectP</i>	GGATCCATGAGCTCAAATATAGCTATC
	EctP-C1		GAATTCAATCTCGACGATCTTAAACGAG
EctPC Δ 30	EctP-N0	pUC19 <i>ectP</i>	GGATCCATGAGCTCAAATATAGCTATC
	EctP-C2		GAATTCAATCACATCACCAACTACCCC
EctPC Δ 53	ForC Δ 30	pUC19 <i>ectP</i>	TAAGGGTACCGAGCTCGAATTCG
	RevC Δ 53		ATCATGTTTCGAGGGCAGGCATTG
EctPC Δ 106	EctP-N0	pUC19 <i>ectP</i>	GGATCCATGAGCTCAAATATAGCTATC
	EctP-C4		GAATTCAATAAGCAAAGAAAACATCATGAC
EctPN Δ 23	EctP-N2	pUC19 <i>ectP</i>	GGATCCATGTTTCATTTTTTCCATTTCTGTGCG
	EctP-C0		GAATTCAATATCGTATTCGTCCCTGGAC
EctPN Δ 23C Δ 30	ForC Δ 30	P19 <i>ectPN</i> 2	TAAGGGTACCGAGCTCGAATTCG
	RevC Δ 30		CACATCACCAACTACCCC

Konstrukt	Primer	Ausgangs-plasmid	Sequenz 5'-3'
BetPCΔ45	ForCΔ45 RevCΔ45	pUC18betP	TAGGGGTACCGAGCTCGAATCG GTAGATCACATCATTGCTTAAG
BetPWTs	B-Sna-1 B-Sna-2 B-Sna-3 B-Sca-1 B-Sca-2 B-Sca-3	pUC18betP	CTTAACTGGTCAGTCTACGTACCAGCCCTAGTC GACTAGGGCTGGTACGTAGACTGACCAGTTAAG GGCAATGGCTAGGCCAC GGATTGATGTTTAGTACTGTCAAGGACTTAAGC GCTTAAGTCCTTGACAGTACTAAACATCAATCC GGCGTGTTGCTCGTCCC
EctPWTs	E-Sna-1 E-Sna-2 E-Sna-3 E-Sca-1 E-Sca-2 E-Sca-3	pUC19ectP	CTCAAATCAGACCCGTACGTATTTTCCATTTCTG CAGAAATGGAAAATACGTACGGGTCTGATTTGAG GGAAATACATGCAAC GTCATGATGTTTAGTACTCTTAAAGGCATGAG CTCATGCCTTTAAGAGTAAACATCATGAC CGTCAGTGGGAAAAG
BetPCECΔ30	ForCΔ30 RevCΔ30	p18betPCE	TAAGGGTACCGAGCTCGAATTCG CACATCACCAACTACCCC
BetPCECΔ53	ForCΔ30 RevCΔ53	p18betPCE	TAAGGGTACCGAGCTCGAATTCG ATCATGTTTCGAGGGCAGGCATTC
EctPNBNΔ37	ForNΔ37 RevNΔ37	p19ectPNB	GGGAAACTGGCCGACGCC CATAAACTCACGGGGATC
EctPNBCΔ106	ForCΔ30 RevC4NB	p19ectPNB	TAAGGGTACCGAGCTCGAATTCG AAGAGTACTAAACATCATGAC
BetPNBCΔ45	ForCΔ30 RevCΔ45	p18betPNE	TAAGGGTACCGAGCTCGAATTCG GTAGATCACATCATTGCTTAAG
EctPNT	Ect-STNF Ect-STNR	pUC19ectP	GCGCCGAGACCATGAGCTCAAATATAGCTATC AAGCTTAATATCGTATTCGTCCCTGG
EctPCT	Ect-STCF Ect-STCR	pUC19ectP	AATGGGAGACCTGAGCTCAAATATAGCTATC GCGCTGAGACCATCGTATTCGTCCCTGGAC
pGEXCEctP	EctP-C0 CEctPpGEXfor	pUC19ectP	GAATTCAATATCGTATTCGTCCCTGGAC GGGATCCCCTTGCTTAAAGGCATGAGTG

Tab. 4: Synthetische Oligodesoxynukleotide zur Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
3-ectP- <i>EcoRI</i>	GAATTCTTAAATATCGTATTC
ectP(400)	TGCCAATGGCTAATGAAG
ectP(800)	GCATTAAGTTACTGTCC
ectP(1200)	GTTGAAGGTGACGTGC
5-EctP- <i>BamHI</i>	GGATCCATGAGCTCAAATATAG
lcoP(400)	GGATTGCGATGATGTTCCG
lcoP(800)	CACCAACAACATCTTG
lcoP(1200)	CCATGGCTATCCCCTCC
-40universal	GTTTTCCCAGTCACGAC
-48reverse	AGCGGATAACAATTCACACAGGA
pASK-IBAfor	GAGTTATTTTACCACTCCCT
pASK-IBArev	CGCAGTAGCGGTAAACG
pGEXseq3	CCGGGAGCTGCATGTGTCTAGAGG
pGEX3seq5	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG

2.2 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

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

Zur Kultivierung von *E. coli* wurde das Vollmedium Luria Bertani (LB) (Bacto Trypton 10 g/l, Bacto Yeast Extrakt 5 g/l, NaCl 5 g/l) bzw. das Vollmedium 2YT (Bacto Trypton 16g/l, Bacto Yeast Extrakt 10 g/l, NaCl 5 g/l) (Sambrock *et al.*, 1989) verwendet. Zur Herstellung von Festmedium wurden vor dem Autoklavieren 15 g/l Bacto Agar zugesetzt. Die Anzucht zur Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte auf SOB-Medium (2% Bacto Trypton, 0,5% Bacto Yeast Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂) (Hanahan, 1985). Nach der Transformation wurden die Zellen in das Regenerationsmedium SOC (SOB mit 20 mM Glucose) (Hanahan, 1985) überführt.

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

2.2.2 Medienzusätze

Die Selektion rekombinanter Stämme erfolgte durch die Zugabe von sterilfiltriertem Carbenicillin (50 µg/ml) bzw. Kanamycin (50 µg/ml) zu den jeweiligen autoklavierten Medien. Die Expression von *ectP* unter Kontrolle des Tetrazyklinpromotors erfolgte durch Zugabe von 200 µg/l Anhydrotetrazyklin (AHT) zum Medium. Zur Expression von Genen, die unter der Kontrolle IPTG-induzierbarer Promotoren vorlagen, wurden dem Medium, wenn nicht anders angegeben, 150 µM IPTG zugesetzt.

2.2.3 Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung von *E. coli*-Zellen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, aerob bei 37°C und 110-130 rpm unter Verwendung der durch die Resistenzmarker benötigten Antibiotika. Die *C. glutamicum*-Kulturen wurden bei 30°C aerob auf Schüttlern bei 130 rpm inkubiert. Die Zelldichte der Bakterienkulturen wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt (Spektrophotometer NovaspecII, Pharmacia Biotech Inc.). Eine Bakterienkultur mit einer OD₆₀₀ von 1 entspricht dabei etwa 10⁹ Zellen pro ml (Miller, 1992). Bakterienstämme, bzw. die mit den entsprechenden Plasmiden transformierten Stämme, wurden als Glycerindauerkulturen gelagert. Hierzu wurden frische Kulturen, die sich in der stationären Wachstumsphase befanden, mit Glycerin (43% Endkonzentration) versetzt. Die Lagerung erfolgte kurzzeitig bei -20°C, längerfristig bei -80°C.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Herstellung transformationskompetenter Zellen und Transformation

Transformationskompetente Zellen der *E. coli*-Stämme DH5 α mc r , JM109 und BL21 wurden nach der Methode von Inoue *et al.* (1990) hergestellt und transformiert. 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 4°C kaltem TB-Puffer (10 mM Pipes (pH 6,7), 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂) gewaschen und in 20ml 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 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 die Zellen für 1 h bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden zentrifugiert, in 100 μl des Überstandes resuspendiert, auf LB-Agar-Platten (50 $\mu\text{g/ml}$ Carbenicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Für die Herstellung kompetenter *E. coli* MKH13 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 OD_{550} von circa 0,4 geschüttelt. Pro Transformationsansatz wurde 1 ml abgenommen, der für 10 min bei 2000 g (4°C) zentrifugiert wurde. Das Sediment wurde in 100 μl TSS (LB-Medium, 10% PEG, 5% DMSO, 50 mM MgCl_2) resuspendiert, 1 μl Plasmid hinzugegeben und der Ansatz für 30 min bei 4°C inkubiert. 900 μl SOC-Medium wurden hinzugegeben und für 1 h bei 37°C geschüttelt. 100 μl des Ansatzes wurden auf LB-Agar-Platten (50 $\mu\text{g/ml}$ Carbenicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Kompetente Zellen von *C. glutamicum* wurden nach der Methode von Liebl *et al.* (1989), modifiziert durch Van der Rest *et al.* (1999), hergestellt und durch Elektroporation (2,5 kV, 600 Ω , 2,5 μF) mit einem Bio-Rad-Gene-Pulser (Bio-Rad, München) mit Plasmiden (1 μg Plasmid DNA pro Transformation) transformiert. Um den Abbau von aus *E. coli* isolierter DNA zu verhindern, wurden die entsprechenden Plasmide zunächst in den restriktionsdefizienten *C. glutamicum* Stamm R127 eingebracht, die Plasmide isoliert und nach Restriktionsanalyse in den gewünschten *C. glutamicum*- Stamm eingebracht.

2.3.2 Konjugativer Plasmidtransfer von *E. coli* nach *C. glutamicum*

Der Plasmidtransfer erfolgte nach der Methode von Schäfer *et al.* (1990). 20 ml LB-Medium wurden mit 400 μl einer Übernachtskultur des plasmidtragenden Donorstammes S17-1 angeimpft bei einer OD_{600} von 1 geerntet und auf Eis gekühlt. 10 ml einer Übernachtskultur des Rezipientenstammes mit einer OD_{600} von ca. 5 wurden für 9 min einem Hitzeschock von $48,5^{\circ}\text{C}$ unterzogen. Zur Konjugation erfolgte die Vereinigung von 3 ml Rezipienten- mit 1 ml Donorkultur. Nach Zentrifugation der Zellen (5 min, 5000g) wurde die Zellen im Rücklauf resuspendiert und auf sterile Nitrozellulosefilter (Typ HA, Millipore, Eschborn, Porendurchmesser 0,45 μm) gegeben, welche LB Platten auflagen. Nach 20 stündiger Inkubation wurden die Zellen mit 1 ml LB Medium abgeschwemmt und diese Zellsuspension

anschließend auf BHI-Agarplatten mit 50 µg/ml des entsprechenden Antibiotikums und 50 µg/ml Nalidixinsäure (zur Hemmung des Wachstums von *E. coli*) ausplattiert.

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

Für die Plasmid-Mini-Präparation aus *E. coli* wurde das GFXTM Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu erhalten wurde das QIAfilter Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet. Die Plasmid-Mini-Präparation aus *C. glutamicum* wurde mit dem QIAprep Plasmid Spin Kit (QIAGEN, Hilden) durchgeführt. Dabei wurden folgende Modifikationen des Ausgangsprotokolls vorgenommen: Die Zellen wurden in der doppelten Menge Puffer P1, der mit 15 mg/ml Lysozym versetzt war, resuspendiert und 60 min bei 37°C unter schütteln inkubiert. Die Volumen der folgenden Puffer P2 und P3 wurden ebenfalls verdoppelt. Der optionale Waschschrift wurde grundsätzlich durchgeführt. Die mit den genannten Methoden isolierte Plasmid-DNA konnte direkt zur Elektroporation oder für die Sequenzierung eingesetzt werden.

2.3.4 Modifikationen von DNA

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

2.3.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur *in vitro*-Amplifizierung von DNA-Fragmenten verwendet (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988). Die zur Klonierung der verschiedenen genetischen Konstrukte von *ectP*, *betP* und *lcoP* verwendeten Oligodesoxynukleotide sind in Tabelle 3 dargestellt. In einem 50 µl PCR-Ansatz wurden 10 ng Plasmid-DNA (Matrize), je 20 pmol Primer, 1 µl eines dNTP-Gemisches (je 10 mM dATP, dCTP, dTTP, dGTP; Sigma, Deisenhofen), 2,5 µl Polymerase (Red-Taq, Sigma) und 5 µl des 10fach konzentrierten Polymerasepuffers gemischt und die PCR gestartet. Die

gewählte Annealingtemperatur richtete sich nach dem verwendeten Primerpaar. In der Regel wurden 30 Zyklen, bestehend aus Denaturierung, Anlagerung der Oligodesoxynukleotide und Elongation, durchgeführt. Zur Durchführung wurden Thermocycler der Firmen Eppendorf (Mastercycler Gradient) und PE Applied Biosystems, Weiterstadt (GeneAmp®PCR System 9700) benutzt.

2.3.5.1 Konstruktion verkürzter *ectP*- und *betP*-Mutanten

Zur Einführung der terminalen Deletionen am *ectP*-Gen wurden die kodierenden Sequenzen mit Ausnahme des zu deletierenden Bereichs amplifiziert. Als *templates* dienten die Plasmide pUC19*ectP* und pUC18*betP*. Nach Reinigung aus einem Agarosegel und Modifikation der eingefügten Restriktionsschnittstellen wurden die PCR-Fragmente in die *SmaI*-Schnittstelle von pUC18/19 ligiert, sequenziert und anschließend in den Expressionsvektor pEKEX2 eingebracht.

2.3.5.2 Konstruktion der *ectP/betP*-Hybride

Mit Hilfe einer Zweischnitt-PCR nach Müller *et al.*, (1978) wurden *SnaBI* bzw., *ScaI* Restriktionsschnittstellen in die für die erste bzw. zwölfte Transmembranhelix kodierenden Sequenzen von *ectP* und *betP* eingeführt, wobei die Plasmide pUC19*ectP* und pUC18*betP* als Matrizen dienten. Bei den auf diese Weise entstandenen Plasmiden pUC19*mectP* und pUC18*mbetP* wurden die für die terminalen Domänen kodierenden Sequenzen durch *SnaBI/BamHI* bzw. *ScaI/EcoRI* Restriktionen ausgetauscht, was zu den Plasmiden pUC18*betpNE*, pUC18*betpCE*, pUC19*ectpNB*, pUC19*ectpCB* führte. In der Folge dienten die Plasmide pUC19*ectpNB* und pUC18*betpNE* als Matrizen für die Herstellung von pUC18*betpNCE* und pUC19*ectpNCB*, welche für C- und N-terminal ausgetauschte Hybride kodierten. Alle Plasmidkonstrukte wurden durch Sequenzierung auf die korrekte Sequenz überprüft und unter Verwendung der *BamHI/EcoRI* Schnittstellen in den Expressionsvektor pEKEX2 ligiert.

2.3.5.3 Konstruktion des *C. glutamicum* Deletionsstammes DHPF

Das Gen *lcoP* wurde durch *allelic replacement* deletiert. Diese Methode nach Schäfer *et al.*, 1994 basiert auf der Selektion einer chromosomalen Deletion, welche durch zwei Rekombinationsereignisse entsteht. Im ersten Schritt wurde *lcoP* einschließlich der flankierenden Regionen durch PCR amplifiziert. Hierzu wurden die Oligodesoxynukleotide Chrom5s [TTC ATC TGG ATC GTC G] und Crom5as [GCA CTT CAG ATT G] verwendet. Das resultierende Fragment (2,5 kb) wurde in die *SmaI*-Schnittstelle von pUC18 ligiert. Das auf diese Weise entstandene Plasmid pUC18*lcoP*chrom wurde zur Kontrolle sequenziert, ein internes *NruI/NcoI*-Fragment deletiert und das verbleibende Plasmid (pUC18Δ*lcoP*chrom) nach einer Klenow-Auffüllreaktion religiert. Nach einer sich anschließenden *PvuII*-Restriktion wurde das Δ*lcoP*-Fragment mit den flankierenden chromosomalen DNA Bereichen isoliert und in die *SmaI*-Schnittstelle des Vektors pK19*mobscaB* ligiert. Das resultierende Plasmid pK19Δ*lcoP* wurde in den Donorstamm *E. coli* S17-1 eingebracht und durch Konjugation in *C. glutamicum* DHPE übertragen. Der Deletionsstamm DHPF (Δ*betP*, Δ*proP*, Δ*putP*, Δ*ectP*, Δ*lcoP*) entstand dabei durch ein doppeltes Rekombinationsereignis (Integration/Exzision). Die Deletion wurde durch PCR nachgewiesen.

2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

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

2.3.7 DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung von Klonierungen und dem Nachweis von Deletionen wurden die jeweils konstruierten Plasmide sequenziert. Die Sequenzreaktion basiert auf der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) und wurde nach Zimmermann *et al.* (1990) modifiziert. Bei dieser Methode wird der Kettenabbruch von Nukleotiden ausgelöst, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die Elongation erfolgt durch eine

modifizierte AmpliTaq®DNA Polymerase. Die Sequenzierreaktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (ABI PRISM™ Big Dye Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit, PE Applied Biosystems, Weiterstadt) und die Sequenzierungsprodukte mit einer automatischen Sequenzierapparatur ABI PRISM 310 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) kapillarelektrophoretisch getrennt und detektiert.

2.4 Allgemeine analytische Methoden

2.4.1 Proteinbestimmungen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde die Methode nach Bradford (1976) angewendet. Zur Erstellung der Eichreihen wurde BSA eingesetzt.

2.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bakterielle Proteine oder Zellextrakte aus *E. coli* wurden in 12,5%-igen bzw. 15%-igen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970) elektrophoretisch getrennt. Die Proteine wurden vor dem Auftrag auf das Gel mit 4-fach konzentriertem Probenpuffer (20% Glycerin, 8% SDS, 400 mM Tris/Cl (pH 6,8), 10 mM EDTA, 100 µM 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). Zur spezifischen Detektion der mit dem Strep-tag bzw. GST (Glutathion-S-Transferase) gekoppelten Protein-Varianten wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt.

2.4.3 Western-Blot-Analyse

Zum immunologischen Nachweis der Proteine mit Antikörpern wurde die Methode von Towbin *et al.* (1979) verwendet. Die Übertragung der Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran wurde mit dem *semi-dry*-Blotverfahren (Kyhse-Andersen, 1984) durchgeführt. Die Blockierung von freien Bindungsstellen auf der Membran erfolgte mit 5% BSA in Waschpuffer (100 mM Tris/Cl (pH 7,5), 9% NaCl). Der anschließende

immunologische Nachweis von Strep-EctP erfolgte mit einem Streptavidin-Alkalische-Phosphatase (AP)-Konjugat (1:5000; BioRad, München). Der immunologische Nachweis der GST-Fusionsproteine erfolgte unter Verwendung des Anti-GST Antikörpers (1:2000; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und anschließender Inkubation mit dem Anti-Goat-IgG-Alkaline-Phosphatase-Konjugat (1:5000; Sigma, Deisenhofen). Der kolorimetrische Nachweis erfolgte durch die Reaktion der alkalischen Phosphatase mit BCIP/NBT (Sigma FastTM-Tabletten, Sigma, Steinheim) in H₂O. 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) beendet.

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) eingesetzt.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Membranpräparation

Für die Präparation von Plasmamembranen aus *ectP*-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 OD₆₀₀ von circa 1 wurde die Kultur mit 200 µg/l AHT (IBA, Göttingen) induziert und mindestens drei weitere Stunden geschüttelt. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden zentrifugiert und mit 100 mM KP_i-Puffer (pH 7,5) gewaschen, wobei 1 mM Pefabloc[®] (Boehringer, Mannheim) zugesetzt wurde. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit einer „French Press“ (2-3Durchgänge; SLM Aminco[®], Rochester, USA) bei einem Druck von 1.100 psi. Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurden die Membranen bei 200.000 g für 1 h sedimentiert, mit dem oben aufgeführten Puffer gewaschen, anschließend in 1 ml Puffer pro Liter Zellkultur resuspendiert und bei -80°C gelagert.

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

Zur Isolierung von EctP wurde das *Strep*-tag[®]II-Peptid (NH₂-WSHPQFEK-COOH; IBA, Göttingen; Schmidt *et al.*, 1996) an den N-Terminus des Proteins fusioniert. Der *Strep*-tag[®]II bindet mit hoher Spezifität an StrepTactin[®] (Voss & Skerra, 1997) und kann mit Desthiobiotin eluiert werden. Die im Folgenden beschriebenen Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Um Plasmamembranen von *E. coli* zu solubilisieren, wurden die Membranpräparationen 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) unter Rühren tropfenweise bis zu einer Konzentration von 2% hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde für mindestens 30 min bei 4°C 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 die Detergenzkonzentration herabzusetzen. Das Säulenmaterial (mit StrepTactin[®] beladene Sepharose; IBA, Göttingen) wurde mit Puffer K' (Puffer K, 0,1% Dodecylmaltosid) äquilibriert. Das verdünnte Solubilisat wurde auf die Säule aufgetragen, wobei die Durchflussrate auf circa 150-200 µl/min eingestellt wurde. Anschließend wurde die Säule mit 3 Säulenvolumen Puffer K' gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit Puffer K'' (Puffer K', 5 mM Desthiobiotin) eluiert. Der Hauptteil des eluierten Proteins befand sich im zweiten und dritten Säulenvolumen. Zur Regeneration der Säule wurde das Desthiobiotin mit circa fünf Säulenvolumen Puffer K (1 mM HABA) verdrängt und anschließend das StrepTactin[®]-Material zur Wiederverwendung mit ca. zwei Säulenvolumen Puffer K gewaschen.

2.5.3 Isolierung von GST-EctP mittels Affinitätschromatographie

Eine zweite Strategie zur Reinigung von EctP bzw. der C-terminalen Domäne von EctP war die Fusion mit der Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum*. Hierzu wurde das „GST Gene Fusion System“ der Firma Amersham Biosciences verwendet. Die Reinigung der GST-Fusionsproteine erfolgt bei dieser Methode durch Affinitätschromatographie, wobei das GST-Protein an immobilisiertes Glutathion bindet während andere Proteine durch stringente Waschschrte entfernt werden. Unter Zugabe reduzierten Glutathions werden die Fusionsproteine eluiert. Durch die Nutzung einer internen Schnittstelle für die Protease Faktor Xa können die GST und das Zielprotein voneinander

getrennt werden, wobei die proteolytische Spaltung vor, bzw. nach Elution mit Glutathion erfolgen kann.

Die Expression der Fusionsgene GST-EctP, GST-CEctP und GST-BetP erfolgte in *E. coli* BL21, welche in 2YT-Medium gezogen wurden. Die Arbeitsschritte wurden wenn nicht anders angegeben bei 4°C durchgeführt. Nach Aufschluss der Zellen in der Frenchpress folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 10000g zur Entfernung der Zelltrümmer. Der Überstand wurde zusammen mit Glutathion-Sepharose für 30-60 Minuten bei RT inkubiert und ungebundene Proteine durch Waschen mit 10 Säulen-Volumen PBS-Puffer (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,5) entfernt. Durch die Zugabe des Faktors Xa (nach Herstellerangaben) und dreistündiger Inkubation bei RT erfolgte die spezifische Freisetzung des Zielproteins in den Überstand. Die Entfernung der an Glutathion-Sepharose gebundenen GST wurde durch den Einsatz von reduziertem Glutathion (10 mM) in 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8 erreicht.

2.5.4 Synthese von [¹⁴C]-Glycinbetain

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

2.5.5 Radiochemische Transportmessungen

2.5.5.1 Messungen der Glycinbetain-Aufnahme in *E. coli* MKH13 Zellen

Die *E. coli* Zellen wurden über Nacht in Minimalmedium angezogen. Nach einer 1/50 Verdünnung der Zellen in frischem Minimalmedium wurden die Zellen bei einer OD₆₀₀ von 0,2 mit 150 µM IPTG induziert und für weitere 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5) gewaschen und eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt. Die Erhöhung der Osmolalitäten erfolgte durch Zugabe von Sorbitol bzw. NaCl. Bei Erhöhung der Osmolalität durch Sorbitol wurden zusätzlich 50 mM NaCl zugegeben. Die Energetisierung der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 10 mM Glukose. Bis zu den Messungen wurden die Zellen auf Eis gelagert.

Vor Beginn der Aufnahmemessungen wurden die Zellen 3 min bei 37°C inkubiert. Der Start der Messungen erfolgte durch die Zugabe von [¹⁴C]-markiertem Substrat. Über einen Zeitraum von 5 min wurden in regelmäßigen Abständen Proben von je 200µl entnommen und mittels einer Mehrfachfiltrationsanlage auf Glasfaserfilter (Typ F, Millipore, Eschborn) abfiltriert, wobei die Filter unmittelbar nach der Filtration mit 5 ml Waschlösung (0,5 M Saccharose, 50 mM MgCl, nach Perroud & Le Rudelier, 1985) gewaschen wurden. Die Filter wurden mit 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und mittels eines Szintillationszählers (LS 6500, Beckmann Coulter Inc., Unterschleissheim-Lohhof) ausgewertet. Durch die lineare Auftragung der Zeit gegen die gemessene Radioaktivität kann mit Hilfe der erhaltenen Steigung die Transportgeschwindigkeit berechnet werden.

$$\text{sp.T.} = \frac{\text{dpm} \times [\text{GB}]}{\text{dpm}_{\text{gesamt}} \times \text{P} \times \text{F} \times \text{OD}}$$

sp.T.: spezifische Transportrate [nmol /min*mg NG]

dpm: Zerfälle pro Minute

[GB]: Glycinbetaingehalt des Probenvolumens [nmol/ml]

dpm_{gesamt}: Gesamt-Radioaktivität des Probenvolumens

P: Entnahmemenge [0,2 ml]

F: Trockengewichtfaktor, für *C. glutamicum* [0,36 mg/ml], für *E. coli* [0,34 mg/ml]

OD: Optische Dichte des Messansatzes

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

Die *C. glutamicum* Zellen wurden über Nacht in BHI-Medium angezogen, abzentrifugiert und zweimal mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5; 4°C) gewaschen und im gleichen Puffer resuspendiert, wobei eine OD₆₀₀ von 3-4 eingestellt wurde. Die Erhöhung der Osmolalitäten erfolgte durch Zugabe von Sorbitol bzw. NaCl. Bei Erhöhung der Osmolalität durch Sorbitol wurden, wenn nicht anders erwähnt, zusätzlich 50 mM NaCl zugegeben. Die Energetisierung der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 10 mM Glukose. Bis zu den Messungen wurden die Zellen auf Eis gelagert. Vor Beginn der Aufnahmemessungen wurden die Zellen 3 min bei 30°C inkubiert. Der Start der Messungen erfolgte durch die Zugabe von [¹⁴C]-markiertem Substrat. Über einen Zeitraum von 1,5-5 min wurden in regelmäßigen Abständen Proben von je 200µl entnommen. Die weitere Bearbeitung der Proben erfolgte wie im Abschnitt 2.5.5.1 beschrieben.

2.5.6 CD-Spektroskopie der C-terminalen EctP-Domäne (CEctP)

Bei der Circulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) handelt es sich um eine Absorptionsspektroskopie, die Aussagen über die Strukturen vieler biologischer Moleküle ermöglicht, z.B. über den Sekundärstrukturgehalt von Proteinen. Unter Circular dichroismus versteht man den Unterschied im Absorptionsverhalten eines Moleküls bezüglich recht- und links-zirkularisiertem Licht. Chirale Moleküle ergeben ein CD-Spektrum, da sie links- bzw. rechts-zirkularisiertes Licht in unterschiedlichem Ausmaß absorbieren. Im Fall von Proteinen ist das chirale (optisch aktive) Zentrum durch die Amidgruppe der Peptidbindung gegeben, wobei sich gezeigt hat, dass unterschiedliche Sekundärstrukturen charakteristische CD-Spektren aufweisen. Die ermittelten molaren Extinktionskoeffizienten werden aus historischen Gründen in die sogenannten „spezifischen Elliptizitäten“ umgerechnet. In Abbildung 4 sind die Standard-CD-Spektren der wichtigsten Sekundärstrukturelemente dargestellt.

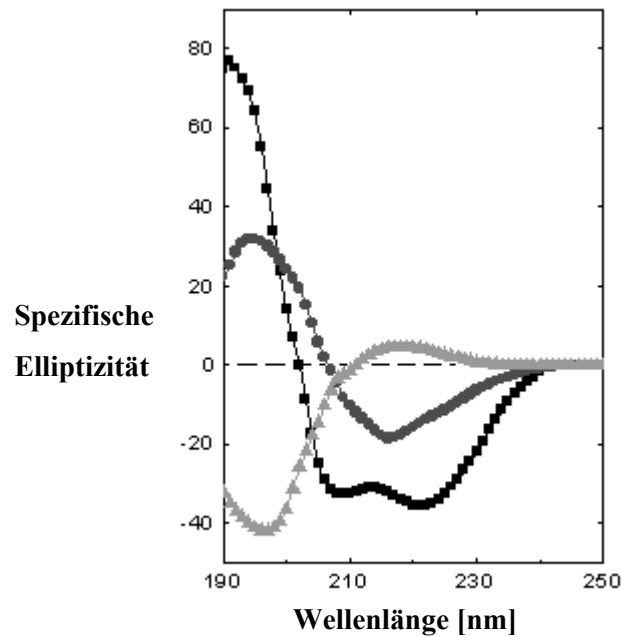


Abb. 4: Standard-CD-Spektren wichtiger Sekundärstrukturelemente. α -Helix (Quadrate), β -Faltblatt (Kreise), „random-coiled“ (Dreiecke)

Die Untersuchungen zum Sekundärstrukturgehalt der C-terminalen EctP-Domäne wurden mit einer Proteinkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ Lösungsmittel durchgeführt. Die Messungen fanden unter folgenden Bedingungen statt:

Wellenlängenbereich: 180-250 nm

Auflösung: 0,1 nm

Geschwindigkeit: 50 nm/min

Akkumulationen: 10

Bandweite: 1 nm

Temperatur: 20°C

Stickstofffluss: 5l/min

3 Ergebnisse

C. glutamicum besitzt mit EctP, BetP und ProP mindestens drei osmotisch regulierte sekundäre Transportsysteme für die Aufnahme der kompatiblen Solute Glycinbetain, Ectoin und Prolin. Durch Deletionen der entsprechenden Gene in *C. glutamicum* ATCC 13032 (Wildtyp) entstand der Stamm DHPE ($\Delta betP$, $\Delta proP$, $\Delta putP$, $\Delta ectP$). Dieser Stamm war nicht mehr in der Lage Ectoin und Prolin aufzunehmen, zeigte jedoch noch eine geringe Glycinbetain Aufnahmerate von ca. 1,4 nmol/(min*mg TG) (Peter *et al.*, 1998b). Da die Studien zur Aktivitätsregulation verkürzter EctP Proteine im homologen System durchgeführt werden sollten, wurde zunächst die verbliebene Glycinbetain-Aufnahmeaktivität detailliert untersucht.

3.1 Identifizierung des Glycinbetain/Ectoin-Aufnahmesystems LcoP

Um festzustellen, ob die Glycinbetain-Aufnahme gegebenenfalls durch einen weiteren, osmosensitiven Transporter katalysiert wird, wurde die Transportaktivität der Stämme DHPE und DHPE/pEKEX2 (DHPE mit dem später zur EctP-Expression verwendeten Leervektor) in Abhängigkeit der externen Osmolalität untersucht. In Abbildung 5 ist zu erkennen, dass in beiden Fällen eine osmotisch regulierte Aufnahme von Glycinbetain zu detektieren war. Interessanterweise zeigte der Stamm DHPE/pEKEX2 unter hyperosmotischen Bedingungen eine deutlich höhere Glycinbetain-Aufnahmerate als der plasmidfreie Stamm DHPE. Während letzterer seine maximale Transportaktivität von 1,5 nmol/(min*mg TG) bei Zugabe von 600-1000 mM NaCl erreichte, wurden im Fall von DHPE/pEKEX2 bis zu 5 nmol/(min*mg TG) bei Zugabe von 600-1000 mM NaCl aufgenommen. Die Untersuchungen zur Ectoin-Aufnahme ergaben ein ähnliches Bild. Die Ectoin-Aufnahmerate erreichte im Stamm DHPE/pEKEX2 ein Maximum von ca. 2,2 nmol/(min*mg TG) bei Zugabe von 750 mM NaCl bzw. 1,3 nmol/(min*mg TG) bei Zugabe von 1250 mM Sorbitol (ohne Abbildung). Bei niedrigen Osmolalitäten (< 300 mM NaCl) konnte weder eine Ectoin- noch eine Glycinbetain-Aufnahme beobachtet werden. Im plasmidfreien Stamm DHPE war auch unter hyperosmotischen Bedingungen keine signifikante Aufnahme von Ectoin nachzuweisen. Nach diesen Versuchen stand fest, dass *C. glutamicum* neben BetP, EctP und ProP mindestens ein weiteres osmotisch reguliertes Transportsystem für die Aufnahme von Glycinbetain und Ectoin besitzen muss, dessen Aktivität aus ungeklärter Ursache durch die Anwesenheit des

Plasmids pEKEX2 beeinflusst wird.

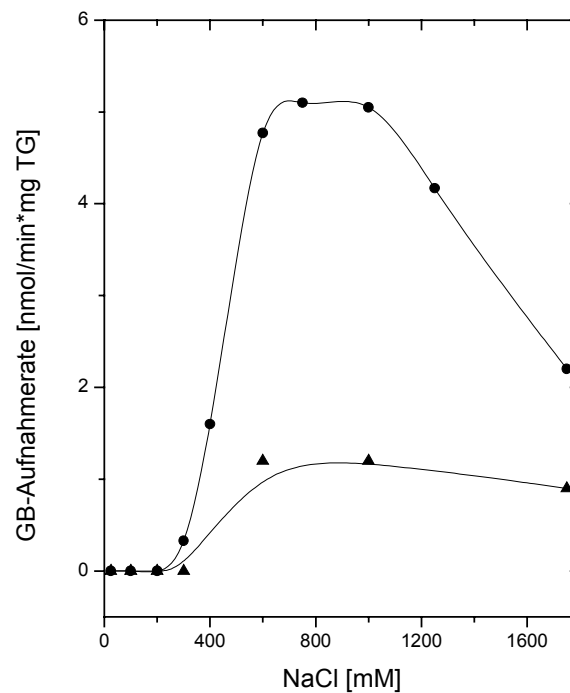


Abb. 5: Glycinbetain-Aufnahmeaktivität von *C. glutamicum* DHPE in Abhängigkeit der externen NaCl-Konzentration. (Kreise): DHPE/pEKEX2; (Dreiecke): plasmidfreier Stamm DHPE

3.1.1 Isolierung des *lcoP* Gens

Durch Datenbankrecherchen konnte ein offenes Leseraster im Genom von *C. glutamicum* ATCC 13032 identifiziert werden, welches signifikante Ähnlichkeiten zu *ectP* und *betP* erkennen ließ. Die computergestützte Analyse der DNA-Sequenz ergab zwei mögliche Translationsstartpunkte an den Positionen 21 und 36 (siehe Anhang 1). Da nur vor dem ATG Kodon an Position 36 eine putative Ribosomenbindestelle (7-14 Basenpaare stromaufwärts) identifiziert werden konnte, handelt es sich bei diesem Kodon wahrscheinlich um den Translationsstartpunkt. Die DNA-Sequenz des Leserasters kodiert für ein 630 Aminosäuren langes Protein, LcoP genannt (low capacity osmoregulated permease), mit einem abgeleiteten isoelektrischen Punkt von 4,73 und einem errechneten Molekulargewicht von 68,3 kDa. Dieses zeigte hohe Identitäten zu Proteinen der BCCT-Familie, z.B. 44% zu einem hypothetischen BCCT-Transporter aus *Streptomyces coelicolor* (Redenbach *et al.*, 1996), 41% zu BetP aus *C. glutamicum* (Peter *et al.*, 1996), 38% zu OpuD aus *B. subtilis* (Kappes *et al.*, 1996) und 34% zu EctP aus *C. glutamicum* (Peter *et al.*, 1998b). In Abbildung 6 ist ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von LcoP mit den Na⁺-Symportern EctP

und BetP aus *C. glutamicum* dargestellt. Wie diese BCCT-Transporter besitzt das Protein LcoP laut Sekundärstrukturvorhersage 12 transmembrane Segmente und terminale, cytoplasmatisch lokalisierte Bereiche mit einem hohen Anteil geladener Aminosäurereste (Abbildung 7). Die Nettoladung der aus 46 Aminosäuren bestehenden N-terminalen Domäne beträgt (+2), die der 101 Aminosäuren langen C-terminalen Domäne (-16).

```
BetP MTTSDPNPKPIVEDAQPEQITATEELAGLLENPTNLEGLKLADEEIIILEGEDTQASLNWSVIVPALVIVLATVVGIGFKDSFTN
LcoP -----MSTNSGNNLPESQESPEEPHYPHDTHPGLVPGISVDAQRNKFGLDKTVFVGVTAALILAFIAWGISPPDSVSS
EctP -----MSSNIAITTEPBKGNKGLKSDPFI FSI SVGFIVVFVIATIALGEKART
      .       : .       : : .       : : .       : * .       : .
      .       : * * *       : .       : : * * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : :

BetP FASSALSSAVVDNLGWAFILFGTVFFVFFIVVIAASKFGTIRLGRIDEAPEFRTVSWISMMFAAGMGIGLMFYGTTEEPLTFYRN----
LcoP VSSTMFSWAMTNTGWLLNFVMLIGIGTMLYIAFSRYGRIKLGTDEDEPEFSRFSWIAMMFGAGIGVGIGIFFFGFPSEPLWHYLSPPPH
EctP TFSAIAGWLLENLGWMYIGGVSLLVFIFLMGIFASRYGRVKLGDDDDDEHTLIVWFCMLFAGGVGAVMLMFWGVAEPINHAFNVPMA
      * : .       : * * *       : .       : : * * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : :

BetP GVPGHDEHNVGVAMSTTFHWTLHPWAIYALVGLAIAYSTFRVGRKQLLSSAFVPLIGEKGAEGWLGKLIDILAIIAITVFGTACSL
LcoP TVEGSTPESLHQALAQSHFHWGLSAWGLYALVGGLALAYSSYRRGRVTLSSTFRSLFGEK-TEGIAGRLIDMMAIIATLFGTAATL
EctP NEEMSEAAIVQAFAYTFYHFGIHMWVIMALPGLSLGYFIYKRKLPRLSSVSPILGKH-IYSTPKLIDVLAIVGTTFGIAVSV
      .       : * : : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : :

BetP GLGALQIGAGLSAANIIEDPSDWTIVGIVSVLTLAFISAISVGVGKGIQYLSANMVLAALLAIFVFVVGPTSILNLPGSIGNY
LcoP GLSAIQVGQGVQIISGASEITNNILIAIAIALTIGFIISSSVSVGVSKGIRYLSNLNISLTLGLVLFVFITGPTLFLLNLIPSSVLEY
EctP GLGVLQINAGMNKLWSTPQVS-WVQLLILILITAVACISVASGLDKGIKLLSNINIAMAVALMFFILFTGPTLTLLRFLVESFGIY
      * * : : * : * : : * : : * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

BetP LSNNFQMAGRTAMSADGTAGEWLGSWTIFYWAWWISWSPFVGMFLARISRGRSIREFILGVLVPAGVSTVWSIFGGTAIVEQ
LcoP GSEFLSMAGKSLSWGEETI-EFQAGWTAFYWAWWIAWTPFVGMFIARISRGRTLREFALITMAIPSFILILAFTIFGGTAITMNRE
EctP ASWMPNLMFWTDSFQDNPG--WQKWTVFYWAWTICWSPYVGMFVARISRGRTVREFIGVLALPAIFGVVVWSIFGRAGIELVS
      * : : .       : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : :

BetP NGESIWGDGAAE----EQLFGLLHALPGGQIMGIIAMILLGTFFITSADSASTVMGTMSQHGQLEANKWVTAAWGVVATAIGLTLL
LcoP NVDGFDGSSSKE----QVLFDMFSNLPLYSITPFILIFVLAVFFVTSADSASVVMGTMSSQGNPANKLIVWFGLCMMGIAVVML
EctP NPGFLTQPTVVEGDVPAALFNVLQEYPLTGIVSAFALVIVIFFFITSIDSAALVNDMFATGAENQTPSYRVWMACTIGAVAGSLL
      * : .       : * .       : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : *

BetP LSGGDNALSNLQNVTIVAATPFLVVIGLMFALVKDLSNDVIYLEYEQRFNARLARERRVHNEHRKRELAAKRRRERKASGAGK
LcoP LTGGESALTGLQNLTILIAIPFALVLIVMAIAFIKDLSTDPAAIRQR-YAKAAISNAVVRGLEHHGDDFELSIEPAAEGRGAGATF
EctP IISPSSGIATLQEVVIVAFFFFLVQFVMFSLLKGMSEDAAVRRVQTRQWEKTDTPEKLEEHSQPAGYDDEGNLPMPALEH
      : . . . : : * : : * * : * * : : : : : * : : * * : : : : : * : : * * : : : .       : : .       : .

BetP RR-----
LcoP DSTADHITDWYQRTDEEGNDVDYDFTTGKWDGWTPESTEEGEVDAKD-----
EctP DEDGNIVIPGNVIEGDLGVVDVDDPEEAQEMGSRFKIVEQTRPQSRDEYDI
```

Abb. 6: Sequenzvergleich des LcoP-Proteins mit EctP (Peter *et al.*, 1998b) und BetP (Peter *et al.*, 1996) aus *C. glutamicum*, zwei Mitgliedern der BCCT-Protein-Familie. Identische Aminosäurereste sind durch Sterne gekennzeichnet. Die postulierten Transmembransegmente sind fettgedruckt und unterstrichen.

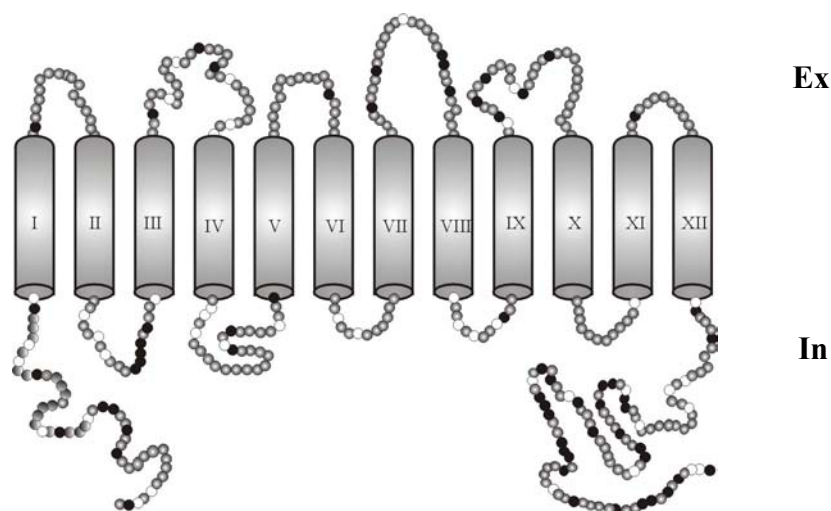


Abb. 7: Topologie-Modell des LcoP-Proteins. Zur Vorhersage der Transmembransegmente wurde das Programm TMHMM (Moller *et al.*, 2002) verwendet. Die negativ geladenen Aminosäurereste sind in schwarz, die positiv geladenen in weiß dargestellt.

3.1.2 Biochemische Charakterisierung von LcoP nach Expression in *C. glutamicum* DHPF

Das *lcoP*-Gen wurde im Stamm DHPE ($\Delta betP$, $\Delta proP$, $\Delta putP$, $\Delta ectP$), wie in Material und Methoden beschrieben, durch „allelic replacement“ deletiert. Im so entstandenen Stamm DHPF ($\Delta betP$, $\Delta proP$, $\Delta putP$, $\Delta ectP$, $\Delta lcoP$) konnte in der Folge keine Aufnahme der kompatiblen Solute Prolin, Ectoin oder Glycinbetain festgestellt werden. Es ist daher davon auszugehen, dass *C. glutamicum* keine weiteren osmotisch regulierten Transporter für die Aufnahme kompatibler Solute besitzt. Der Stamm DHPF eignet sich daher ideal zur Untersuchung der Aktivitätsregulation verkürzter EctP-Varianten.

Die Glycinbetain-Aufnahmeaktivität des chromosomal kodierten LcoP-Transporters im Stamm DHPE war sehr gering. Um eine biochemische Charakterisierung des Transporters zu erleichtern, sollte die Expressionshöhe von *lcoP* gesteigert werden. Dazu wurde das *lcoP*-Gen mittels PCR amplifiziert, die korrekte Sequenz durch Sequenzierung verifiziert und in das IPTG-induzierbare Plasmid pEKEX2 ligiert. Das resultierende Plasmid pLcoP wurde in den Stamm DHPF eingebracht und die Transportaktivität für Glycinbetain bei Erhöhung der externen Osmolalität ermittelt. In Abbildung 8 ist zu erkennen, dass die Glycinbetain-Aufnahmeaktivität deutlich über den zuvor im Stamm DHPE gemessenen Aufnahmeraten lag. Während letzterer eine maximale Rate von ca. 1,3 nmol/(min*mg TG) erreichte (vergleiche Abbildung 5), konnten im Stamm DHPF/pLcoP 4 bzw. 7 nmol/(min*mg TG) detektiert

werden. Die Höhe der ermittelten maximalen Transportaktivitäten hing vom verwendeten Osmotikum ab. Während LcoP bei niedrigen Osmolalitäten (< 700 mosm) inaktiv war, wurden die maximalen Transportaktivitäten bei ca. 1300 mosm (Sorbitol, Abbildung 8b) bzw. 1600 mosm (NaCl, Abbildung 8a) erreicht. Bei dem Kontrollstamm DHPF/pEKEX2 war unter identischen Bedingungen keine Aufnahme kompatibler Solute festzustellen.

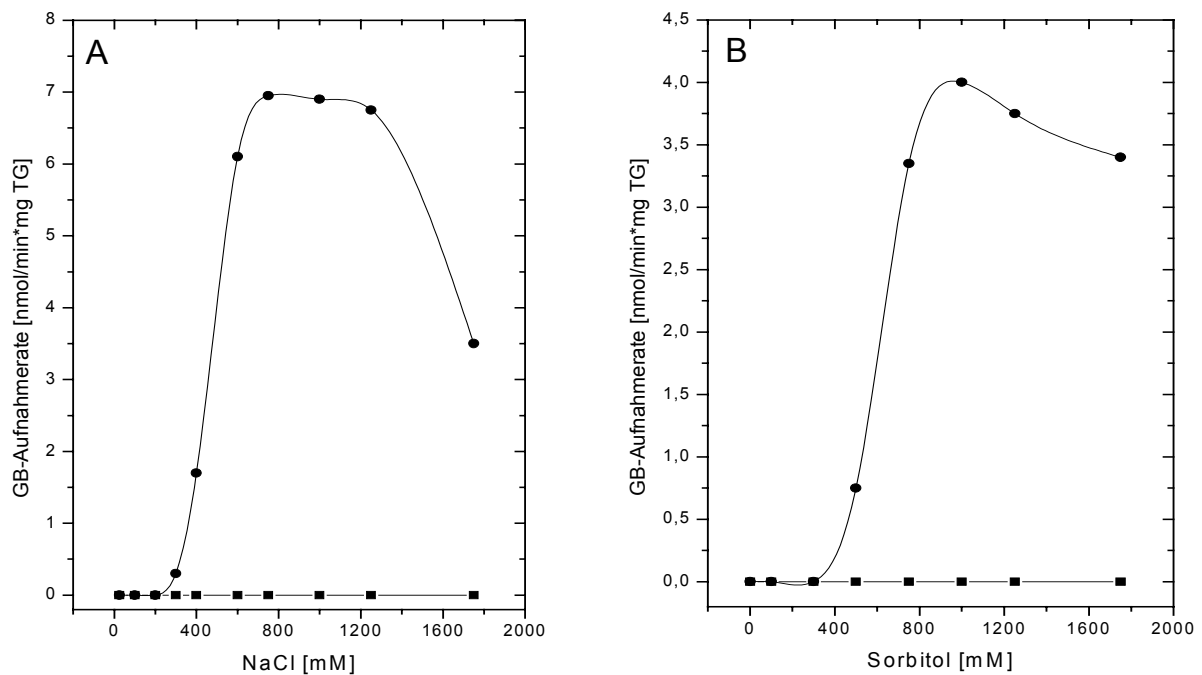


Abb. 8: Aktivierung der Glycinbetain-Aufnahme der Stämme DHPF/pLcoP (Kreise) und DHPF/pEKEX2 (Quadrate) in Abhängigkeit der externen Osmolalität. (A) Erhöhung der externen Osmolalität durch Zugabe von NaCl. (B) Erhöhung der externen Osmolalität durch Zugabe von Sorbitol.

3.1.3 Kinetische Parameter von LcoP in *C. glutamicum* DHPF

Zur weiteren Charakterisierung des LcoP-Transporters wurden die kinetischen Parameter der Glycinbetain- und Ectoin-Aufnahme nach IPTG-Induktion im Stamm DHPF/pLcoP bestimmt (Abbildung 9). Wie der Tabelle 5 zu entnehmen ist, besitzt LcoP eine deutlich höhere Affinität zu Glycinbetain als zu Ectoin. Der ermittelte K_m -Wert für Ectoin war mit $538 \mu\text{M}$ dreimal höher als der entsprechende Wert für Glycinbetain [$154 \mu\text{M}$]. Für beide Substrate ergab sich eine maximale Aufnahmegeschwindigkeit von ca. $8,5 \text{ nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg TG})$. Die Bestimmung des K_m -Wertes für Natrium zeigte außerdem, dass die Aufnahme kompatibler Solute durch LcoP strikt an die Verfügbarkeit externen Natriums gekoppelt ist.

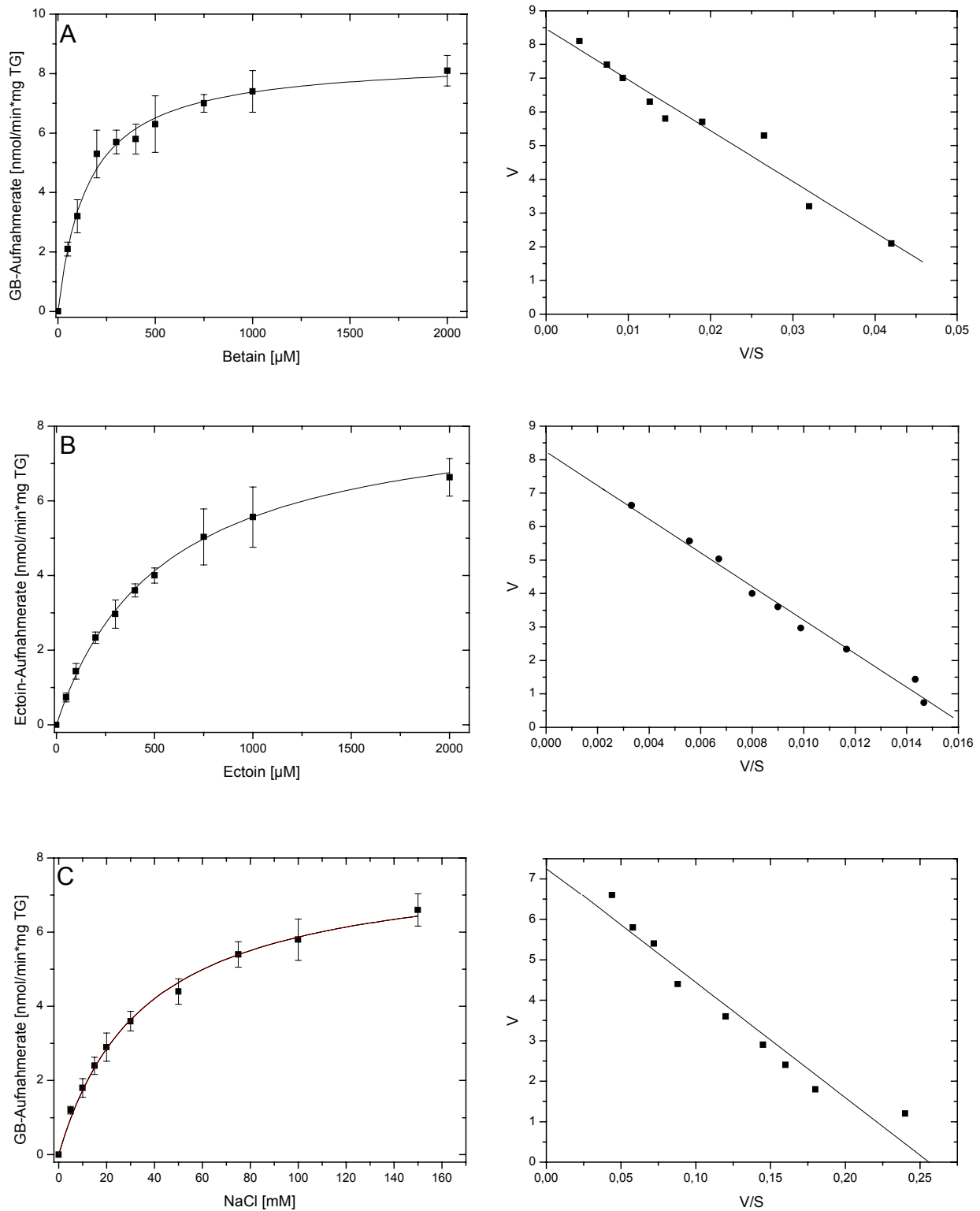


Abb. 9: Kinetische Parameter des plasmidkodierte LcoP-Proteins im Stamm *C. glutamicum* DHPF/pLcoP. Die Bestimmung der K_m -Werte für Glycinbetain (A) und Ectoin (B) erfolgte in Anwesenheit von 50 mM KP_i -Puffer (pH 7,5) mit 750 mM NaCl. Zur Ermittlung des K_m -Wertes für Natrium (C) wurde 50 mM KP_i -Puffer (pH 7,5) mit 1500 mM Sorbitol zur Einstellung der externen Osmolalität verwendet. Die nebenstehenden Abbildungen zeigen die jeweiligen Eadie-Hofstee-Plots.

Tabelle 5: Kinetische Parameter der Glycinbetain- und Ectoin-Aufnahme von LcoP in *C. glutamicum* DHPF

kinetische Parameter	<i>C. glutamicum</i> DHPF
K_m Glycinbetain [μM]	$153,8 \pm 14,8$
K_m Ectoin [μM]	$539 \pm 40,7$
K_m Na^+ [mM]	$35,8 \pm 2,4$
V_{\max} Glycinbetain [nmol/(min*mg TG)]	$8,5 \pm 0,2$
V_{\max} Ectoin [nmol/(min*mg TG)]	$8,6 \pm 0,3$

3.1.4 Physiologische Bedeutung von LcoP

Die biochemische Charakterisierung des LcoP-Transporters zeigte, dass dieses Protein durch hyperosmotische Bedingungen aktiviert wird und die Aufnahme von Ectoin und Glycinbetain im Symport mit Na^+ -Ionen vermittelt. Die maximalen Glycinbetain-Aufnahmeraten des Transportsystems im Stamm DHPE waren mit $1,3 \text{ nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg TG})$ jedoch sehr niedrig. Somit stellte sich die Frage, ob die Glycinbetain-Transportkapazität des LcoP-Proteins einen physiologisch relevanten Einfluss auf die Adaptationsfähigkeit der Zellen bei hyperosmotischem Stress besitzt. Zur Beantwortung dieser Frage wurden die *C. glutamicum* Deletionsstämme DHPE ($\Delta betP$, $\Delta proP$, $\Delta putP$, $\Delta ectP$) und DHPF ($\Delta betP$, $\Delta proP$, $\Delta putP$, $\Delta ectP$, $\Delta lcoP$) in Cg XII-Minimalmedium unter hyperosmotischen Stressbedingungen (1500 mosm) angezogen. In Abbildung 10 ist das Wachstum der Stämme in Anwesenheit von 10 mM externem Glycinbetain, bzw. ohne Glycinbetain, nach einem osmotischen „Shift“ auf 2500 mosm dargestellt. Beide Stämme wuchsen unter diesen Bedingungen sehr langsam. Die Verfügbarkeit externen Glycinbetains führte im Fall von *C. glutamicum* DHPE zu einer deutlich verkürzten „lag“-Phase nach einem hyperosmotischen Schock. Während der Stamm bei Abwesenheit externen Glycinbetains erst nach 15 Stunden in die exponentielle Wachstumsphase eintrat, wurde diese bei Glycinbetain-Verfügbarkeit bereits nach 8 Stunden erreicht. Nach Deletion des *lcoP*-Gens im Stamm DHPF konnte extern zugeführtes Glycinbetain das Wachstum des Stammes nicht beschleunigen. Der Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase erfolgte unverändert nach ca. 20 Stunden. Diese Ergebnisse

zeigten, dass die LcoP vermittelte Glycinbetain-Aufnahme unter spezifischen Bedingungen zu einem signifikanten Vorteil beim Adaptationsprozess hyperosmotisch gestresster Zellen führt.

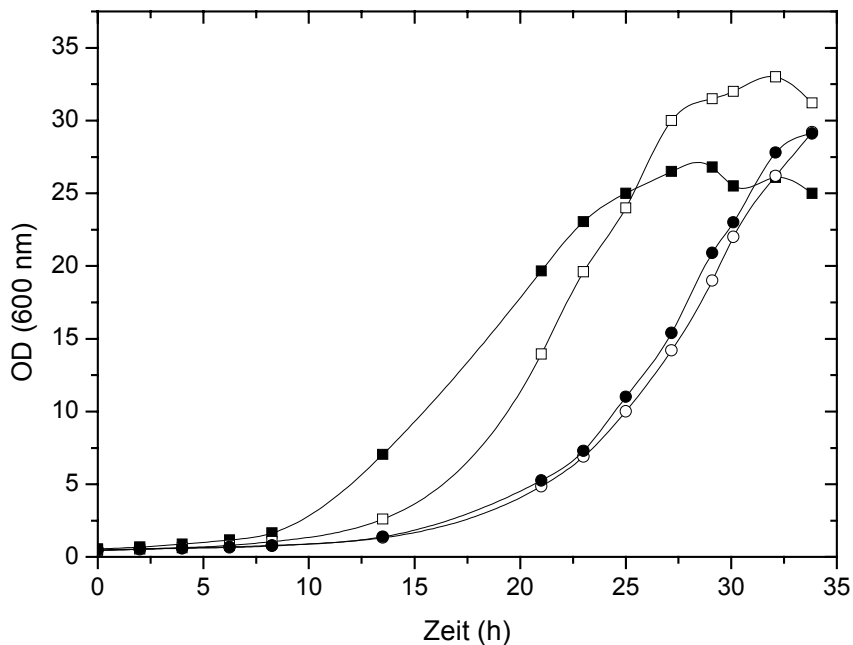


Abb. 10: Wachstumsvergleich der *C. glutamicum* Deletionsstämme DHPE (Quadrate) und DHPF (Kreise) in Cg XII-Minimalmedium. Die externe Osmolalität wurde durch Zugabe von NaCl auf 2500 mosm eingestellt. Geschlossene Symbole: Zugabe von 10 mM Glycinbetain. Offene Symbole: keine externen kompatiblen Solute.

Neben einer Beteiligung am osmotischen Adaptationsprozess unterstützen osmotisch regulierte Transporter für kompatible Solute die Anpassung von Bakterien an andere lebensfeindliche Umweltbedingungen. So belegen Studien zur Aktivitätsregulation des osmosensitiven ABC-Transportsystems „Glycine betaine porter II“ aus *Listeria monocytogenes*, dass dieser Transporter auch durch einen Kälteschock und den damit einhergehenden Änderungen in der Lipidfluidität aktiviert werden kann (Gerhardt *et al.*, 2000). Da bekannt ist, dass auch die Aktivierung von BetP durch Änderungen des physikalischen Zustandes der Membranumgebung beeinflusst wird (Rübenhagen *et al.*, 2000), sollte untersucht werden, ob die BCCT-Transporter BetP, LcoP und EctP ebenfalls auf kälteinduzierte Änderungen der Membranfluidität reagieren. Die Stämme *C. glutamicum* DHPF/pBetP, DHPF/pEctP und DHPF/pLcoP wurden bei 30°C gezogen, einem 3 minütigen Kälteschock unterzogen und die Glycinbetain-Aufnahmeaktivität der Zellen bestimmt. In

Abbildung 11 ist zu erkennen, dass BetP durch Kältestress signifikant aktiviert werden konnte. Das Aktivitätsoptimum von ca. 8 nmol/(min*mg TG) wurde bei einer Erniedrigung der Temperatur auf 15°C erreicht. Ohne Kälteschock (200 mosm, 30°C) konnte hingegen keine signifikante Transportaktivität detektiert werden. In einem Kontrollexperiment (Kältestress bei gleichzeitigem hyperosmotischen Stress) nahm die Transportaktivität mit steigenden Temperaturen (5-30°C) kontinuierlich zu. Zudem waren deutlich höhere Transportaktivitäten von bis zu 55 nmol/(min*mg TG) (1400 mosm, 30°C) zu beobachten. EctP und LcoP reagierten in identischen Experimenten nicht mit einer signifikanten Kälteaktivierung (ohne Abbildung). Es bleibt jedoch zu bedenken, dass die Aktivierung von BetP durch Kältestress nur etwa 15% seiner maximalen Aktivität unter hyperosmotischen Bedingungen betrug. Da EctP und LcoP bei hyperosmotischem Stress wesentlich geringere Aktivitäten als BetP aufweisen (vergleiche Abbildungen 8 und 13), wäre eine sehr schwache Kälteaktivierung ($< 0,2$ nmol/min*mg TG) der Transporter aufgrund der limitierenden Messtechnik nicht feststellbar.

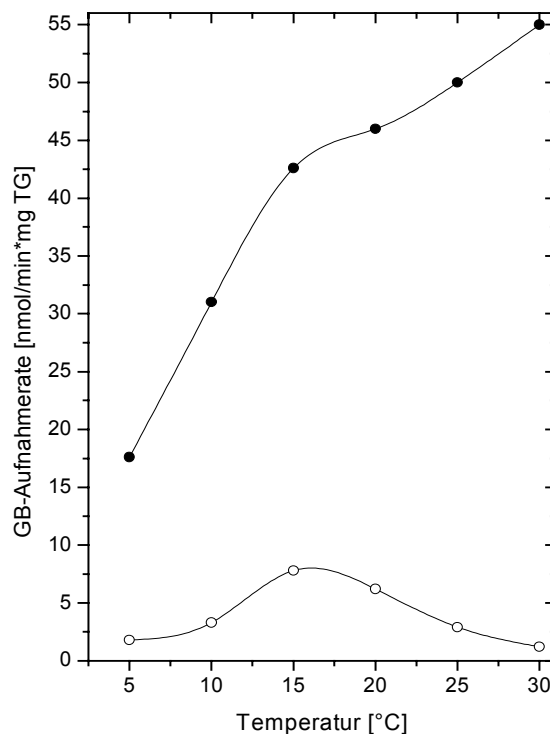


Abb. 11: Kälteaktivierung der Glycinbetain-Aufnahme von *C. glutamicum* DHPF/pBetP. Das Wachstum der Zellen erfolgte *u.N.* bei 30°C. Die Zellen wurden nach einmaligem Waschen in 50 mM KP_i -Puffer (pH7,5; 50 mM NaCl) überführt und einem dreiminütigen Kälteschock unterzogen. Die Osmolalitäten der Messpuffer betragen 200 mosm (offene Kreise) bzw. 1400 mosm (geschlossene Kreise). Die Aufnahme-Messungen wurden durch die Zugabe von 750 μ M Glycinbetain (GB) gestartet.

3.2 Untersuchungen zur Osmoregulation von EctP

Neben BetP, dem bestuntersuchten sekundären Transportsystem für Glycinbetain und dem oben beschriebenen, neu entdeckten Transporter LcoP, war bekannt, dass *C. glutamicum* mit EctP einen weiteren sekundären Na⁺-Symporter aus der BCCT-Familie besitzt. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass dieses Ectoïn/Glycinbetain/Prolin-Transportprotein, wie LcoP und BetP, durch hyperosmotischen Stress aktiviert wird (Peter *et al.*, 1998b). Im Unterschied zu BetP handelt es sich bei EctP um ein Protein mit einem breiten Substratspektrum. Zudem konnte, im Gegensatz zur *betP*, eine Induktion der *ectP* Expression auf Aktivitätsebene nicht nachgewiesen werden. Diese Erkenntnisse weisen auf eine Rolle von EctP als „SOS-Aufnahmesystem“ für kompatible Solute hin.

Untersuchungen an verkürzten BetP-Proteinen hatten gezeigt, dass die terminalen, cytoplasmatisch lokalisierten Domänen des Proteins eine wichtige Funktion bei der Wahrnehmung und Verarbeitung hyperosmotischer Signale spielen (Peter *et al.*, 1998a). Auf der einen Seite zeigten N-terminal verkürzte BetP-Varianten unter hyperosmotischen Bedingungen eine Verschiebung des Aktivitätsoptimums zu höheren Osmolalitäten. Auf der anderen Seite führte die partielle Entfernung von mehr als 22 Aminosäureresten der C-terminalen Domäne zu einem osmotisch insensitiven und damit permanent aktiven Transporter. Bei vollständigem Verlust der C-terminalen Domäne kam die katalytische Aktivität zum Erliegen (Peter *et al.*, 1998a). Interessanterweise besitzen alle bisher untersuchten osmotisch regulierten Proteine der BCCT-Familie derartige, cytoplasmatisch lokalisierte Extensionen, welche an der Aktivitätsregulation der Proteine beteiligt sein könnten. Folglich galt es zu untersuchen, ob es sich bei der Osmoregulation durch die terminalen Domänen von BetP um proteinspezifische Eigenschaften handelt, oder ob eine derartige Aktivitätsregulation einen generellen Mechanismus bei der Wahrnehmung und Verarbeitung osmotischer Signale innerhalb der BCCT-Familie darstellt. Da zu Beginn der Arbeit nichts über die Existenz des LcoP-Proteins bekannt war, wurde der Transporter EctP für die folgenden Studien herangezogen.

3.2.1 Funktion verkürzter EctP- und BetP-Varianten in *C. glutamicum* DHPF

Erste Untersuchungen zum Regulationsmechanismus von EctP wurden an verkürzten Protein-Varianten durchgeführt. Die terminalen Bereiche von EctP wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, durch den Einsatz molekularbiologischer Techniken schrittweise

verkürzt. Auf diese Weise entstanden eine N-terminal verkürzte (EctPN Δ 23) und vier C-terminal verkürzte Protein-Varianten (EctPC Δ 12, EctPC Δ 30, EctPC Δ 53, EctPC Δ 106) (Tabelle 6). Bei EctPN Δ 23 und EctPC Δ 106 handelt es sich um Mutanten, deren jeweilige terminale Domäne vollständig entfernt wurde (vergleiche Abbildung 12). Zusätzlich wurde eine doppelt verkürzte EctP-Mutante (EctPC Δ 30N Δ 23), welcher 30 Aminosäurereste der C-terminalen Domäne und die vollständige N-terminale Domäne fehlen, sowie eine C-terminal verkürzte BetP-Mutante (BetPC Δ 45) hergestellt.

Tabelle 6: N- und C-terminal verkürzte Protein-Varianten

Bezeichnung der Protein-Varianten	Anzahl und Lokalisierung der entfernten Aminosäurereste
EctPC Δ 12	12, C-terminal
EctPC Δ 30	30, C-terminal
EctPC Δ 53	53, C-terminal
EctPC Δ 106	106, C-terminal
EctPN Δ 23	23, N-terminal
EctPC Δ 30N Δ 23	30, C-terminal; 23, N-terminal
BetPC Δ 45	45, C-terminal

In der Regel wurde die externe Osmolalität bei den folgenden Experimenten durch Zugabe von Sorbitol erhöht, da es sich bei EctP und BetP um Na⁺-Symporter handelt. Bei der Verwendung von NaCl würde sich neben der Osmolalität auch die Konzentration des Co-Substrats Na⁺ erhöhen. Die damit einhergehende Erhöhung des chemischen Na⁺-Gradienten könnte Effekte auf die Transportaktivitäten der Proteine haben, zumal gezeigt wurde, dass C-terminal verkürzte BetP-Varianten stark erniedrigte Na⁺-Affinitäten aufweisen (Peter *et al.*, 1998a). Um den Einfluss einer erhöhten Co-Substrat-Konzentration auf die Aktivitäten der Transporter zu vermeiden, wurde nur dann NaCl zur Erhöhung der Osmolalität eingesetzt, wenn bei extrem hohen Osmolalitäten gearbeitet werden musste, beispielsweise um das Aktivitätsoptimum der N-terminal verkürzten Mutante EctPN Δ 23 zu bestimmen. Sorbitol eignet sich nicht zur Einstellung extremer Osmolalitäten, da die Viskosität hochkonzentrierten Sorbitols schnelle kinetische Messungen verhindert.

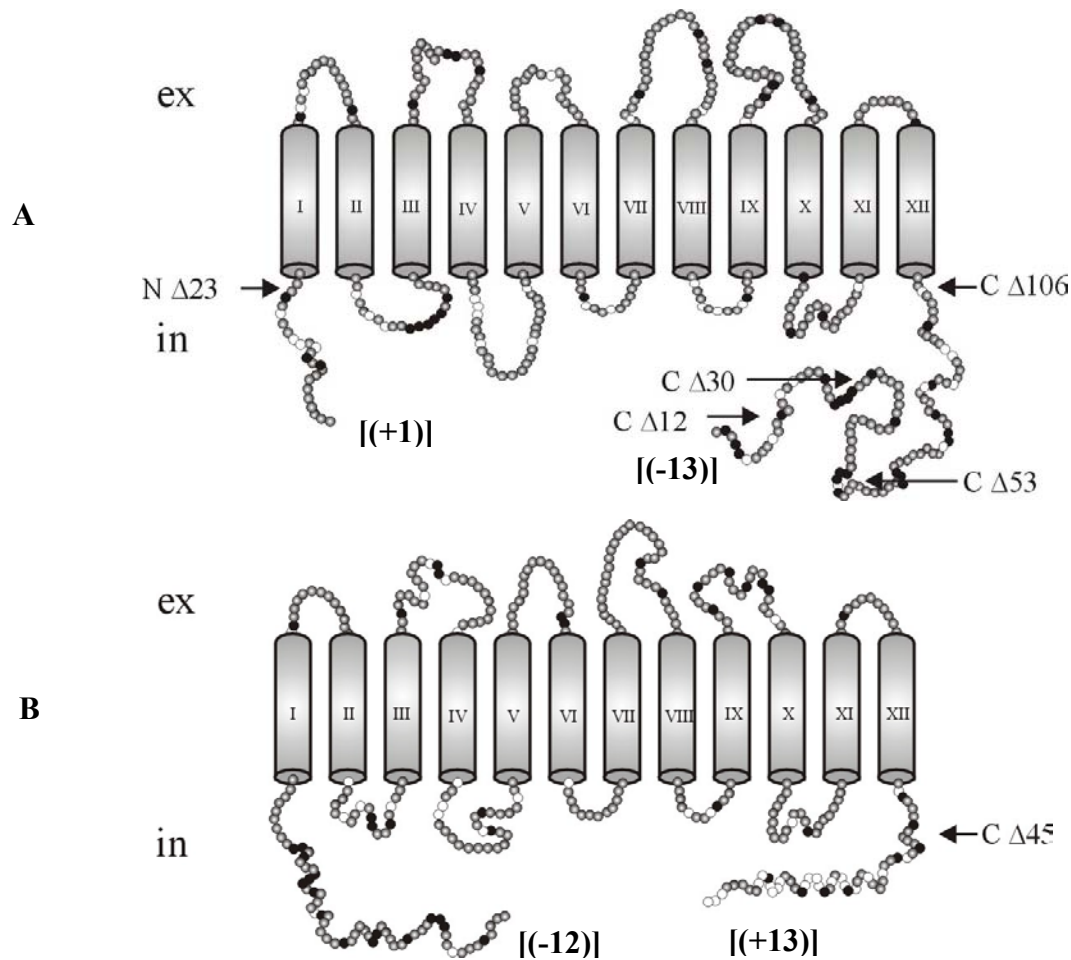


Abb. 12: Topologie-Vorhersage der Proteine EctP (A) und BetP (B). Die eingeführten Verkürzungen sind durch Pfeile markiert. Negativ geladene Aminosäurereste sind in schwarz, positive in weiß dargestellt. Die Nettoladungen der terminalen Domänen sind in Klammern angegeben.

Abbildung 13 zeigt die Regulation der Glycinbetain-Aufnahme von plasmidkodierten, C-terminal verkürzten EctP-Proteinen im Vergleich zum Wildtyp Protein. Während das Entfernen von 12 Aminosäuren am C-Terminus (EctPC Δ 12) keinen Effekt bezüglich der Regulation erkennen ließ, zeigte die um 30 Aminosäuren verkürzte Proteinvariante (EctPC Δ 30) bei niedrigen Osmolalitäten (200 mosm) bereits 65% ihrer maximalen Transportaktivität, welche bei ca. 950 mosm (750 mM Sorbitol) erreicht wurde. Das Protein reagierte auf Erhöhung der externen Osmolalität mit einer Aktivitätszunahme, wie sie auch für eine C-terminal um 12 Aminosäuren verkürzte BetP-Mutante beobachtet wurde (Peter *et al.*, 1998a). Erst die vollständige Entfernung der C-terminalen Domäne (EctPC Δ 106) führte zum Verlust der Fähigkeit, Änderungen der osmotischen Bedingungen wahrzunehmen. Das Protein war, unabhängig von der externen Osmolalität, permanent katalytisch aktiv, d.h. es

hatte die osmosensorischen Eigenschaften vollständig verloren und war dereguliert. Abbildung 13B zeigt die Ergebnisse eines analog durchgeführten Experiments mit der entsprechenden C-terminal verkürzten BetP-Variante (BetPC Δ 45). Diese wurde konstruiert, weil eine um 52 Aminosäuren verkürzte BetP-Variante in früheren Experimenten (Peter *et al.*, 1998a) keine katalytische Aktivität zeigte und daher auf eine aktivierende Funktion der C-terminalen Domäne von BetP geschlossen wurde. Interessanterweise führte die nahezu vollständige Entfernung der C-terminalen Domäne im Fall von BetPC Δ 45, unabhängig von der externen Osmolalität, ebenfalls zu einer permanenten Glycinbetain-Aufnahme, wie sie zuvor für EctPC Δ 106 beobachtet wurde. Demzufolge besitzen die C-terminalen Extensionen von EctP und BetP identische Funktionen. Sie inhibieren die Transportaktivitäten der Proteine bei fehlendem hyperosmotischem Stress und sind an der Wahrnehmung eines osmotischen Signals beteiligt. Abbildung 13C zeigt die Aktivitätsregulation des N-terminal verkürzten EctP-Proteins (EctPN Δ 23) im Vergleich zum Wildtyp-Protein (EctP). Die Transportaktivitäten beider Proteine waren strikt osmotisch reguliert. Demzufolge ist die N-terminal verkürzte Mutante weiterhin in der Lage, Änderungen in der externen Osmolalität wahrzunehmen. Das Aktivitätsoptimum von EctPN Δ 23 war jedoch im Vergleich zu EctP signifikant in den Bereich höherer Osmolalitäten verschoben. Während die maximale Aufnahmerate des Wildtyp-Proteins bei ca. 1000-1200 mM NaCl (2200 mosm) lag, wurde das Optimum für EctPN Δ 23 selbst bei Zugabe von 1750 mM NaCl (3700 mosm) nicht erreicht. Eine N-terminale Verkürzung am EctP-Protein hat somit den gleichen Effekt wie die entsprechende Verkürzung am BetP-Transporter (Peter *et al.*, 1998a). Beide Proteine zeigten eine herabgesetzte Sensitivität gegenüber hyperosmotischem Stress. Ein Vergleich der einfachen N- bzw. C-terminal verkürzten Mutanten EctPN Δ 23 und EctPC Δ 30 mit der korrespondierenden doppelt verkürzten Mutante EctPN Δ 23C Δ 30 ist in Abbildung 13D dargestellt. Die Glycinbetain-Aufnahmeaktivität der doppelt verkürzten Mutante war im Vergleich zu den Einzelverkürzungen signifikant herabgesetzt, jedoch war sie nach wie vor osmotisch reguliert und zeigte eine Verschiebung der maximalen Transportaktivität zu hohen Osmolalitäten, wie sie bei der N-terminalen Einzelverkürzung zu beobachten war. Offensichtlich dominiert im Fall von EctP der Verlust der N-terminalen Domäne über eine Verkürzung der C-terminalen Domäne. Die umgekehrte Situation wurde für BetP beschrieben. Hier verhalten sich gleichzeitige Verkürzungen an beiden terminalen Domänen wie die entsprechende C-terminale Verkürzung (Peter *et al.*, 1998a).

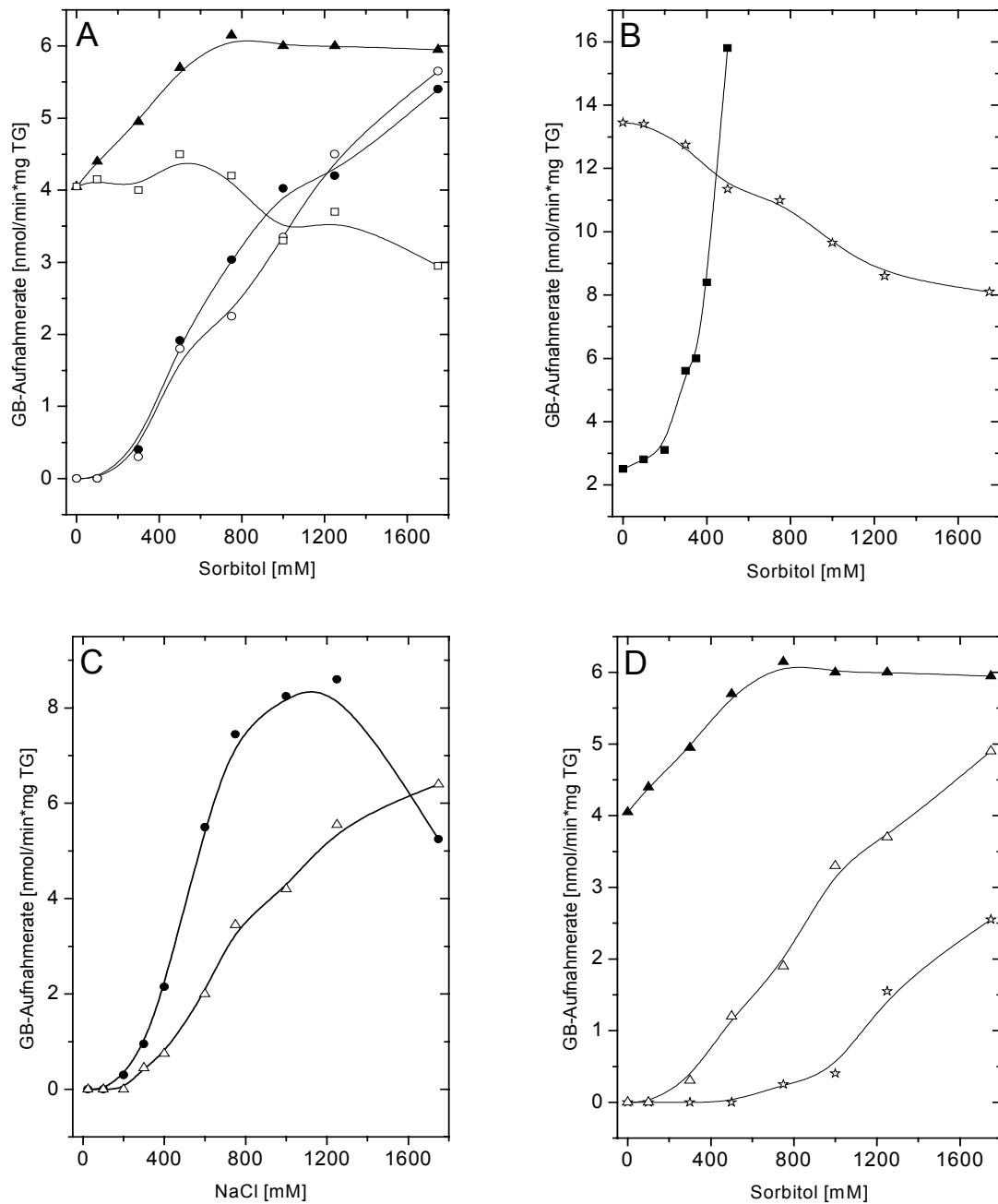


Abb. 13: Osmotische Aktivierung der Glycinbetain-Aufnahme verkürzter Mutanten. Die Abhängigkeit der Glycinbetain-Aufnahme von der externen Osmolalität wurde in den Stämmen DHPF/pEctP (Wildtyp), DHPF/pBetP (Wildtyp) und in verschiedenen DHPF Stämmen, die plasmidkodiert verkürzte *ectP*- und *betP*-Allele tragen, gemessen. **(A)** DHPF/pEctP (Kreise), DHPF/pEctPCΔ12 (offene Kreise), DHPF/pEctPCΔ30 (Dreiecke), DHPF/pEctPCΔ106 (offene Quadrate); **(B)** DHPF/pBetP (Quadrate), DHPF/pBetPCΔ45 (offene Sterne); **(C)** DHPF/pEctP (Kreise) DHPF/pEctPNΔ23 (offene Dreiecke); **(D)** DHPF/pEctPCΔ30 (Dreiecke), DHPF/pEctPNΔ23 (offene Dreiecke), DHPF/pEctPNΔ23CΔ30 (offene Sterne). Die Zellen wurden üN. in BHI Medium mit 150 μ M IPTG und 50 μ g/ml Kanamycin kultiviert und nach einmaligem Waschen in 50 mM KP_i -Puffer, pH 7,5 resuspendiert. Nach dreiminütiger Inkubation im Messpuffer wurden die Messungen durch Zugabe von 750 μ M Glycinbetain gestartet. Die externe Osmolalität wurde durch die Zugabe von Sorbitol (A, B, D) bzw. NaCl (C) eingestellt.

3.2.2 Affinität verkürzter EctP-Varianten zu Natrium

Für C-terminal verkürzte BetP-Varianten war gezeigt worden, dass sie stark erniedrigte Affinitäten für das Co-Substrat Na^+ aufweisen. Bei vollständiger Entfernung der C-terminalen BetP-Domäne kam zudem die Transportaktivität der Mutante zum Erliegen. Aus diesen Beobachtungen wurde gefolgert, dass der C-Terminus direkt an der Natrium-Bindung beteiligt sein könnte (Peter *et al.*, 1998a).

Um die Natriumabhängigkeit der verkürzten EctP-Transporter genauer zu untersuchen, wurden die Glycinbetain-Aufnahmeaktivitäten der Proteine bei konstanter Osmolalität und steigenden NaCl Konzentrationen zwischen 0 und 200 mM bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt. Interessanterweise zeigten auch die C-terminal verkürzten EctP-Proteine die bei BetP beobachtete Abnahme der Na^+ -Affinität. Bereits bei der um 12 Aminosäurereste verkürzten EctP-Mutante war ein signifikanter Abfall der Na^+ -Affinität um ca. 20 mM zu beobachten. Bei vollständiger Entfernung der C-terminalen Domäne stieg der K_m -Wert für Natrium um mehr als 100 mM auf 143 mM. Somit ist die Länge der C-terminalen EctP-Domäne direkt mit der Na^+ -Affinität der jeweiligen Protein-Variante korreliert. Generell gilt: je kürzer die C-terminale Domäne, desto niedriger die Affinität zu Na^+ (Tabelle 7). Da EctP selbst bei vollständiger Entfernung der C-terminalen Domäne katalytisch aktiv war, ist eine unmittelbare Beteiligung der C-terminalen Domäne an der Na^+ -Bindung jedoch auszuschließen.

Tabelle 7: K_m -Werte der verkürzten EctP-Proteine für Na^+

Protein-Variante	K_m -Werte für Na^+ [mM]
EctP (Wildtyp)	$39 \pm 5,0$
EctPC Δ 12	$58 \pm 8,4$
EctPC Δ 30	$62 \pm 7,2$
EctPC Δ 53	$73 \pm 6,1$
EctPC Δ 106	$143 \pm 6,5$

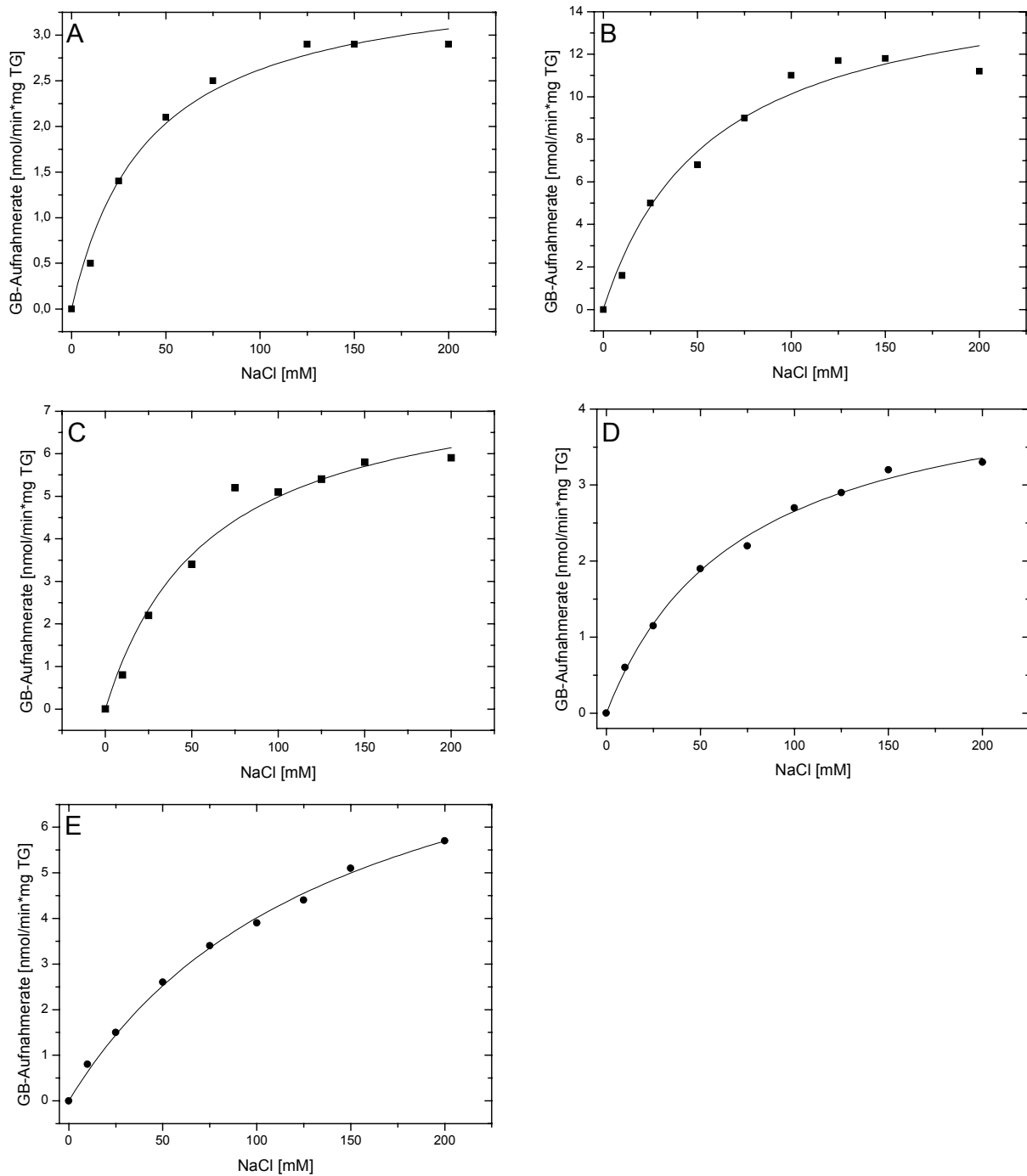


Abb. 14: Km-Werte der C-terminal verkürzten EctP-Proteine nach Synthese im Stamm DHPF. (A) EctP, (B) EctPC Δ 12, (C) EctPC Δ 30, (D) EctPC Δ 53, (E) EctPC Δ 106. Die Messungen erfolgten für A und B bei konstanten 1850 mosm, für C, D und E bei konstanten 800 mosm.

3.2.3 Regulatorische Eigenschaften von EctP/BetP-Chimären in *C. glutamicum* DHPF

Die überraschende Beobachtung, dass Modifikationen im Bereich der terminalen Domänen von EctP und BetP sehr ähnliche Einflüsse auf die Regulationsmuster beider Transportproteine hatten, obwohl gerade in diesen Bereichen keine Sequenzidentitäten zu finden sind, führte zu der Frage, ob diese regulatorischen Eigenschaften bei einem wechselseitigen Austausch der Domänen erhalten bleiben. Wäre dies der Fall, sollten chimäre EctP/BetP-Proteine ihre Sensitivität gegenüber hyperosmotischem Stress beibehalten.

Die Konstruktion der Chimären erfolgte durch den im Folgenden beschriebenen molekularbiologischen Ansatz. Die Einführung von Restriktionsschnittstellen in die kodierenden Bereiche zwischen der N-terminalen Domäne und dem ersten Transmembransegment (*Sna*BI-Schnittstelle) bzw. dem zwölften Transmembransegment und der C-terminalen Domäne (*Sca*I-Schnittstelle) führte zu den Genen *mectP* und *mbetP*. Aufgrund der eingeführten Schnittstellen kam es in den kodierten Proteinen zu einem Austausch von je drei Aminosäureresten. Im Fall von mEctP wurde F24 gegen Y, I25 gegen V und L509 gegen T ausgetauscht, während bei mBetP I63 durch Y, A539 durch S und L540 durch T ersetzt wurden. Basierend auf den rekombinanten Genen *mectP* und *mbetP* erfolgte die Herstellung von sechs Hybriden, die einen vollständigen Satz von sechs chimären Proteinen kodieren. In vier Fällen wurde nur der N- bzw. C-terminale Bereich ersetzt (BetPNE, EctPNB, BetPCE, EctPCB), in zwei Fällen erfolgte ein wechselseitiger Austausch beider Domänen (BetPNCE, EctPNCB) (Abbildung 15). Die Aktivitätsregulation von mEctP und den auf dem zentralen Bereich von EctP basierenden Chimären ist in Abbildung 16A dargestellt. Eine osmotisch beeinflusste Glycinbetain-Aufnahme konnte nur im Fall von mEctP beobachtet werden. Die EctP-Chimären mit ausgetauschtem N-terminalen Bereich (EctPNB und EctPNCB) zeigten keine Glycinbetain-Aufnahme. Der C-terminale Austausch im Fall von EctPCB führte zu einem katalytisch aktiven, jedoch deregulierten Protein und ähnelte phänomenologisch dem C-terminal verkürzten Protein EctPC Δ 106 (vergleiche Abbildung 13A). Eine funktionelle Komplementierbarkeit der C-terminalen EctP Domäne durch die C-terminale BetP Domäne ist somit auszuschließen. Die Tatsache, dass Chimären nur in Anwesenheit der N-terminalen Domäne von EctP aktivierbar sind, weist auf eine essentielle Bedeutung dieser Domäne für die Aktivierbarkeit der rekombinanten EctP-Proteine hin.

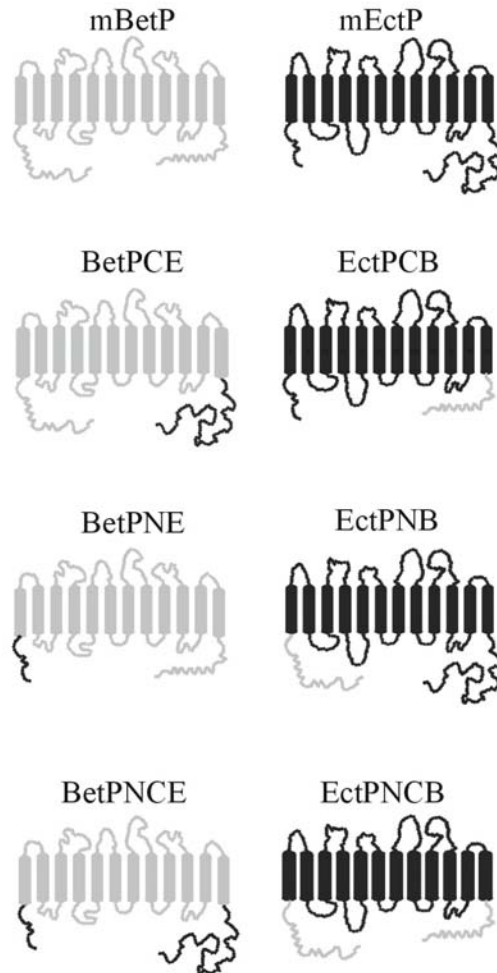


Abb. 15: EctP- und BetP-Chimären. Schematische Darstellung der chimären EctP- und BetP-Proteine. EctP und ausgetauschte EctP-Domänen sind schwarz, BetP und ausgetauschte BetP-Domänen sind grau dargestellt.

Wie aus Abbildung 16B hervorgeht stellte sich die Situation für mBetP und die BetP-Chimären weitaus komplexer dar. Neben mBetP reagierte auch BetPNE auf erhöhte Osmolalität mit gesteigerter Transportaktivität, wobei das Protein auch ohne osmotischen Stress bereits 60% seiner maximalen Aktivität erreichte. Die Sensitivität von BetPNE gegenüber hyperosmotischen Bedingungen geht dabei auf die native C-terminale Domäne von BetP zurück, denn bei zusätzlichem Austausch der C-terminalen Domäne (BetPNCE) war keine funktionelle Komplementation zu beobachten. Es kam wie bei EctPCB zum vollständigen Verlust der Osmosensitivität. Interessanterweise konnte nach einem Einzelaustausch der C-terminalen Domäne (BetPCE) keine katalytische Aktivität mehr festgestellt werden.

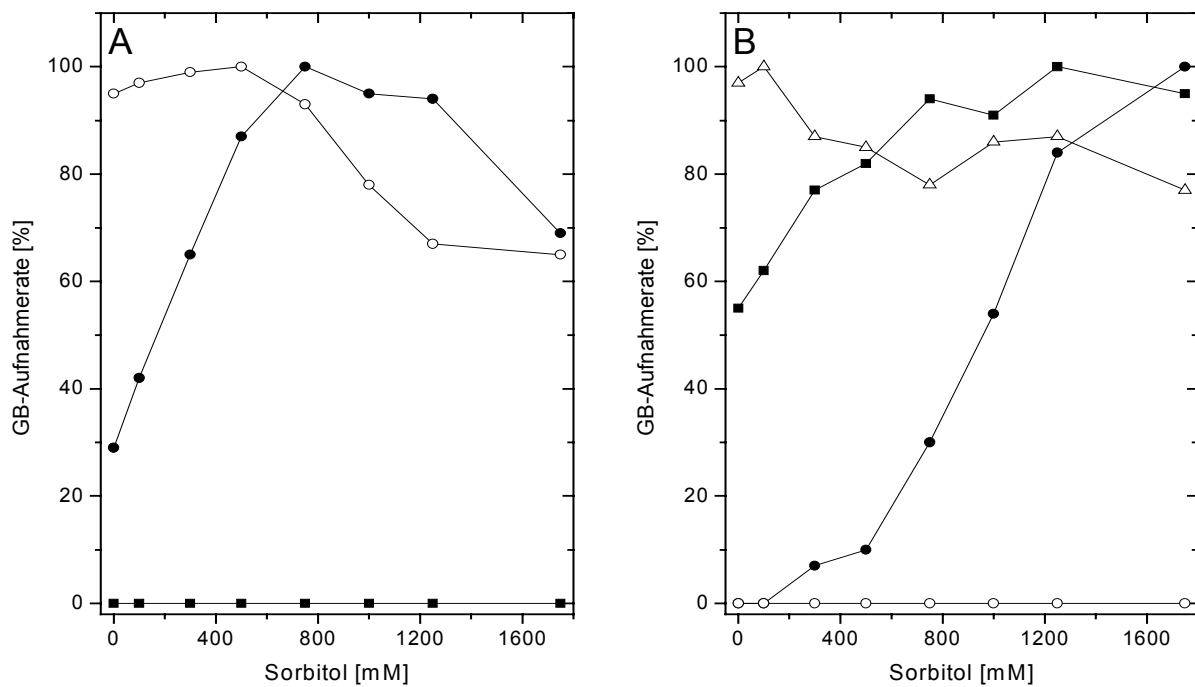


Abb. 16: Glycinbetain-Aufnahme von EctP/BetP-Chimären in *C. glutamicum* DHPF

Die Glycinbetain-Aufnahme der Stämme DHPF/pmBetP, DHPF/pmEctP (Wildtyp Proteine, die aufgrund der in die kodierenden Sequenzen eingeführten Restriktionsschnittstellen je drei Aminosäureaustausche tragen) und der DHPF Stämme, die verschiedene *ectP/betP*-Allele plasmidkodiert exprimieren, wurde in Abhängigkeit der externen Osmolalität gemessen. **(A)** DHPF/pmEctP (Kreise), DHPF/pEctPCB (offene Kreise), DHPF/pEctPNB und DHPF/pEctPNCB (Quadrate); **(B)** DHPF/pmBetP (Kreise), DHPF/pBetPNE (Quadrate), DHPF/pBetPNCE (offene Dreiecke), pBetPCE (offene Kreise). Die jeweils maximale Aufnahme-Aktivität wurde als 100% gesetzt. Die Anzucht der Zellen erfolgte in BHI-Medium. Die Expression der Hybride erfolgte durch die Zugabe von IPTG. Die Absolutwerte der Glycinbetain-Aufnahme betragen für DHPF/pmEctP, 20-68 nmol/(min*mg TG); DHPF/pEctPCB, 9-5,7 nmol/(min*mg TG); DHPF/pmBetP, 0-26 nmol/(min*mg TG); DHPF/pBetPNE, 2,6-4,8 nmol/(min*mg TG); DHPF/pBetPNCE, 3,4-2,6 nmol/(min*mg TG).

Da die absoluten Glycinbetain-Aufnahmeaktivitäten der chimären EctP- und BetP-Proteine deutlich unter denen von mEctP bzw. mBetP lagen (vergleiche Legende Abbildung 16), erfolgte die Darstellung der Transportraten in relativen Werten. In einem Kontrollexperiment, bei dem 200 mM NaCl statt 50 mM NaCl verwendet wurden, ohne dabei die Gesamtosmolalität des Messpuffers zu erhöhen, konnten die maximalen Transportraten der Chimären BetPNCE und BetPNE um das Dreifache erhöht werden (Daten nicht gezeigt). Dieser stimulierende Effekt war bei den inaktiven Chimären BetPCE, EctPNB, und EctPNCB nicht feststellbar. Die relativ geringen Transportraten von BetPNCE und BetPNE sind somit auf eine stark herabgesetzte Affinität der Proteine zu ihrem Co-Substrat Natrium

zurückzuführen. Die Affinitätserniedrigung ist jedoch nicht für den Aktivitätsverlust der Chimären BetPCE, EctPNB, und EctPNCB verantwortlich.

Um Hinweise auf die Ursachen der Inaktivität von BetPCE, EctPNB, und EctPNCB zu erhalten, wurden Experimente mit den in Tabelle 8 aufgeführten, zusätzlich verkürzten Chimären durchgeführt. Eine plausible Hypothese für den Aktivitätsverlust der Chimären könnte beispielsweise der Austausch einer kurzen Domäne gegen eine signifikant längere, raumfüllendere Domäne sein, welche die Aktivierung der Transporter sterisch behindert. Experimente zur Glycinbetain-Aufnahme von EctPNBN Δ 37, BetPCEC Δ 30 und BetPCEC Δ 53 zeigten jedoch, dass selbst Verkürzungen der ausgetauschten Domänen auf die Länge der WT-Domänen nicht zu aktivierbaren Transportern führen (Abbildung 17). Als weitere Möglichkeit für die Inaktivität von EctPNB und BetPCE wurden störende Interaktionen zwischen zwei negativ geladenen cytoplasmatischen Domänen (vergleiche Abbildung 12) postuliert. Auch diese Hypothese musste verworfen werden, da die vollständige Entfernung der C-terminalen Domäne im Fall von EctPNBC Δ 106 nicht zur Wiederherstellung der Aktivierbarkeit der Chimäre beitrug (Abbildung 17).

Tabelle 8: Verkürzte EctP/BetP-Chimären

Protein-Variante	Beschreibung der Protein-Varianten
BetPCEC Δ 30	BetP mit C Δ 30-Extension von EctP
BetPCEC Δ 53	BetP mit C Δ 53-Extension von EctP, die Länge der C-Extension entspricht der Länge der BetP-WT-Extension
EctPNBN Δ 37	EctP mit N Δ 37-Extension von BetP, die Länge der N-Extension entspricht der Länge der BetP-WT-Extension
EctPNBC Δ 106	EctP ohne C-Extension, mit N-Extension von BetP
BetPNEC Δ 45	BetP mit N-Extension von EctP und ohne C-Extension

Die Untersuchung der Glycinbetain-Aufnahmeaktivität des zusätzlich verkürzten chimären Proteins BetPNEC Δ 45 bestätigte die Annahme, dass die Osmosensitivität von BetPNE auf die Funktion der originalen C-terminale Domäne von BetP zurückzuführen ist. Die Aktivitätsregulation von BetPNEC Δ 45 ähnelte denen von BetPNCE (Abbildung 16) bzw. BetPC Δ 45 (Abbildung 17). Das Protein war katalytisch aktiv, hatte jedoch die Sensitivität

gegenüber hyperosmotischem Stress verloren..

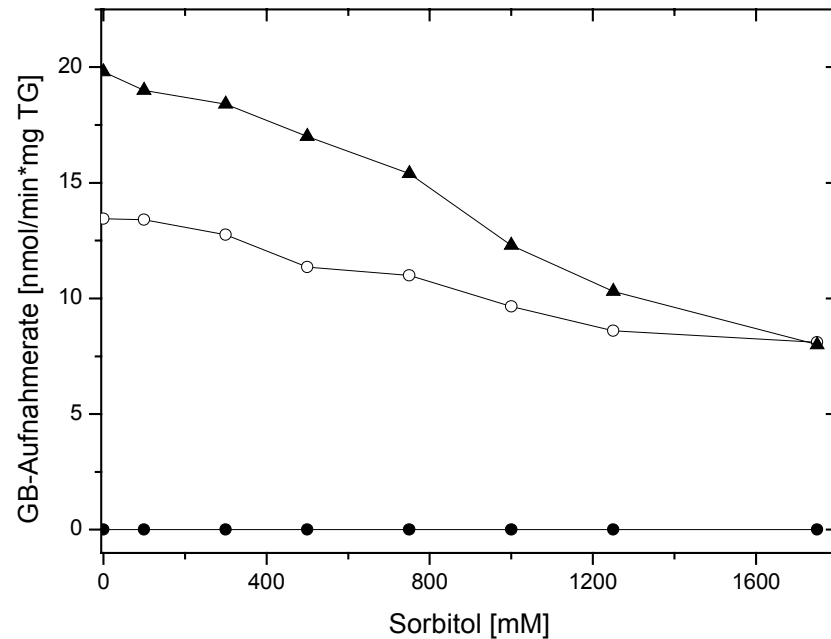


Abb. 17: Glycinbetain-Aufnahme von verkürzten EctP/BetP-Chimären in *C. glutamicum* DHPF
Die Glycinbetain-Aufnahme der *C. glutamicum* Stämme DHPF/pBetPNECA45 (offene Kreise), DHPF/pBetPCA45 (Dreiecke) und der Stämme DHPF/pEctPNBNΔ37, DHPF/pBetPCECA30, DHPF/pBetPCECA53, DHPF/pEctPNBCA106 (Kreise) wurde in Abhängigkeit der externen Osmolalität gemessen. Die Anzucht der Zellen erfolgte in BHI-Medium. Die Expression der Hybride erfolgte durch die Zugabe von IPTG.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass sich die terminalen Domänen von EctP und BetP, obwohl sie offensichtlich sehr ähnliche Funktionen bei der Aktivitätsregulation der Transportproteine ausüben, bei einem wechselseitigen Austausch nicht funktionell ersetzen können.

3.2.4 Lokalanästhetika wirken am zentralen Bereich des EctP-Proteins

Amphiphile Lokalanästhetika, wie beispielsweise Tetracain, beeinflussen den physikalischen Zustand einer biologischen Membran signifikant. Es wird vermutet, dass diese Substanzen die intrinsische Membranspannung und/oder die Ladungsverteilung an den Oberflächen der Lipiddoppelschicht verändern. Daher werden diese Substanzen häufig genutzt, um den Einfluss der Phospholipidumgebung auf die katalytische Aktivität integraler Membranproteine zu untersuchen (Lambert *et al.*, 1995; Peter *et al.*, 1998b; Rübenhagen *et al.*, 2000; Van der Heide *et al.*, 2001). Der spezifische Wirkmechanismus der Lokalanästhetika auf einzelne Proteine ist jedoch bis heute nicht geklärt. Sowohl *in vivo*, als auch *in vitro*, reagiert BetP auf die Zugabe von Tetracain mit einer erhöhten Glycinbetain-Aufnahmeaktivität, was phänomenologisch der Reaktion auf hyperosmotischen Stress sehr ähnelt (Peter *et al.*, 1998b; Rübenhagen *et al.*, 2000). Auf Grundlage der detaillierten Kenntnisse zur Aktivitätsregulation von BetP und der Verfügbarkeit einer Auswahl verkürzter EctP- und BetP-Varianten sollte untersucht werden, welche Proteinbereiche (der zentrale Bereich zwischen erstem und zwölftem Transmembransegment oder die cytoplasmatisch lokalisierten Domänen) sensitiv gegenüber Tetracain sind. Aus diesem Grund wurden die Transportaktivitäten der Wildtyp Proteine und der EctP- und BetP-Varianten mit vollständig entfernten N- bzw. C-terminalen Domänen bei Zugabe des Lokalanästhetikums bestimmt, um auf diese Weise dessen Wirkort definieren zu können. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt. Im Gegensatz zu BetP, reagierte EctP auf die Anwesenheit von Tetracain, bei vorheriger halbmaximaler osmotischer Aktivierung, mit einer signifikant herabgesetzten Glycinbetain-Aufnahmeaktivität (Abbildung 18A). Da ein identischer Effekt für die C-terminal verkürzte Mutante EctPC Δ 106 zu beobachten war, ist die C-terminale Domäne von EctP als Wirkort des Tetracains auszuschließen. Interessanterweise war ein inhibitorischer Effekt, wie er für das Wildtyp Protein und das C-terminal verkürzte Protein gezeigt werden konnte, bei vollständiger Entfernung der N-terminalen Domäne (EctPN Δ 23) nicht zu beobachten. Stattdessen kam es bei Tetracain-Konzentrationen zwischen 100 und 300 μ M zu einer signifikant erhöhten Glycinbetain-Aufnahmeaktivität, wie sie für das BetP Protein beschrieben wurde (Peter *et al.*, 1996, Abbildung 18B). Es ist jedoch wichtig zu betonen, dass die Sensitivität gegenüber dem Lokalanästhetikum erhalten blieb, denn das Protein reagierte trotz Verlust der N-terminalen Domäne auf die Anwesenheit von Tetracain, was diese als Wirkort ausschließt. Die Wahrnehmung des Lokalanästhetikums erfolgt daher über den zentralen Bereich des EctP-Proteins.

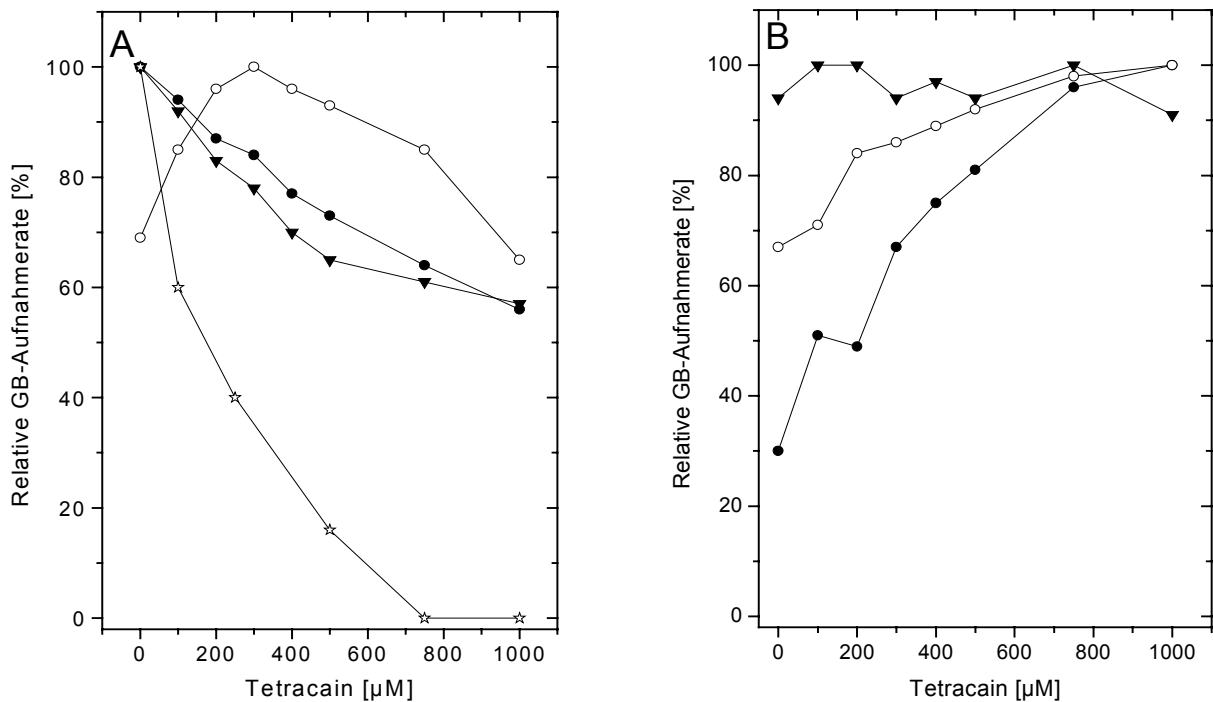


Abb. 18: Effekte des Lokalanästhetikums Tetracain auf die osmotische Aktivierung verkürzter EctP- und BetP-Proteine. Untersucht wurde der Einfluss des amphiphilen Lokalanästhetikums Tetracain auf die Glycinbetain-Aufnahmeaktivität der Stämme DHPF/pEctP (Wildtyp) und DHPF/pBetP (Wildtyp) und einiger DHPF Stämme, die verkürzte *ectP*- bzw. *betP*-Mutanten plasmidkodiert exprimieren. **(A)** DHPF/pEctP (Kreise), DHPF/pEctPCΔ106 (Dreiecke), DHPF/pEctPNΔ23 (offene Kreise). **(B)** DHPF/pBetP (Kreise), DHPF/pBetPCΔ45 (Dreiecke), DHPF/pBetPNΔ60 (offene Kreise). Die externe Osmolalität wurde durch die Zugabe von NaCl eingestellt, sodass die Aktivität der einzelnen Proteine bei ca. 50% ihrer maximalen Transportraten lag. Zusätzlich wurde die Glycinbetain-Aufnahmeaktivität von DHPF/pEctP nach osmotischer Voraktivierung durch Sorbitol bestimmt (offene Sterne). Die jeweils höchste Aufnahmeaktivität eines Proteins wurde als 100% gesetzt. Die Absolutwerte der Glycinbetain-Aufnahme betrugen für DHPF/pEctP, 5,7-3,3 nmol/(min*mg TG); DHPF/pEctP bei Voraktivierung durch Sorbitol, 3,0-0,0 nmol/(min*mg TG); DHPF/pEctPCΔ106, 4,7-2,7 nmol/(min*mg TG); DHPF/pEctPNΔ23, 4,2-2,7 nmol/(min*mg TG); DHPF/pBetP, 50-167 nmol/(min*mg TG); DHPF/pBetPCΔ45, 32-35 nmol/(min*mg TG) und DHPF/pBetPNΔ60, 16,2-25,7 nmol/(min*mg TG).

In Abbildung 18B ist zu erkennen, dass ein Verlust der N-terminalen Domäne im Fall von BetP (BetPNΔ60) keinen signifikanten Einfluss auf Aktivierung von BetP durch Tetracain hat. Wie beim Wildtyp-Protein, kommt es bei der N-terminal verkürzten Mutante zu einer gesteigerten Transportaktivität. Das C-terminal verkürzte Protein (BetPCΔ45) reagierte hingegen nicht auf die Anwesenheit des Lokalanästhetikums. Es muss jedoch bedacht werden, dass BetPCΔ45 gegenüber Änderungen der externen Osmolalität insensitiv ist und

bereits bei niedrigen Osmolalitäten seine maximale Transportaktivität erreicht (vergleiche Abbildung 17). Eine weitere Aktivitätssteigerung durch Tetracain-Zugabe ist demzufolge nicht zwingend zu erwarten. Die C-terminale Domäne von BetP kann daher als Wirkort von Tetracain nicht ausgeschlossen werden.

3.2.5 Einfluss unterschiedlich geladener amphiphiler Moleküle auf die Aktivität von EctP und BetP

Die Aktivitäten der Glycinbetain-Transportsysteme BetP aus *C. glutamicum* und OpuA aus *L. lactis* werden entscheidend von der Zusammensetzung der Phospholipidumgebung beeinflusst (Rübenhagen *et al.*, 2000; Van der Heide *et al.*, 2001). Mit steigendem Anteil negativ geladener Phospholipide, erhöht sich der Schwellenwert der osmotischen Aktivierbarkeit beider Transportproteine. Detaillierte Untersuchungen an OpuA zeigten, dass dieser Effekt auf Änderungen in der Verteilung der Oberflächenladungen der Membran zurückzuführen ist. Bei Verwendung unterschiedlich geladener amphiphiler Moleküle erleichterte die Einführung positiver Ladungen die Aktivierung dieses ABC-Transporters, während negative Ladungen die Transportaktivität inhibierten. Unter der Annahme, dass im Laufe der Evolution osmosensitiver Transportsysteme ähnliche Regulationsmechanismen Verwendung fanden, wurde von Van der Heide *et al.* (2001) ein einheitliches Model zur Wahrnehmung osmotischer Signale postuliert, welches auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Proteinen und der Phospholipidmembran beruht. Da EctP und BetP, wie OpuA, sensitiv auf die Anwesenheit amphiphiler Moleküle reagieren, galt es zu prüfen, ob diese generalisierte Hypothese für die Transporter der BCCT-Familie haltbar ist. Daher wurde der Einfluss unterschiedlich geladener Lokalanästhetika auf die Stämme DHPF/pEctP, DHPF/pBetP und DHPF/pLcoP untersucht, wobei Tetracain (positive Nettoladung unter physiologischen Bedingungen), Dekan (ungeladen) und Capronsäure (negative Nettoladung) verwendet wurden. In Abbildung 19 ist die Bestimmung der maximal wirksamen Konzentrationen der einzelnen Lokalanästhetika dargestellt. Diese lag in allen Fällen im Bereich von 0,75-1,25 mM. Unter den getesteten Substanzen zeigte Tetracain den signifikantesten Effekt auf die Aktivierbarkeit der Proteine. Tetracain hemmte die Aktivitäten von LcoP und EctP konzentrationsabhängig um bis zu 50%, während die Glycinbetain-Aufnahmeaktivität von BetP um bis zu 60% stieg. Capronsäure und Dekan erhöhten die Aktivitäten von BetP und LcoP um maximal 15%. Interessanterweise führte die Verwendung der negativ geladenen Capronsäure in höheren Konzentrationen (> 1 mM) zu einer schwachen

Hemmung der EctP-Aktivität. Die Ergebnisse sprechen gegen eine Übertragbarkeit des OpuA Modells auf die Transportproteine der BCCT-Familie, da dieses eine gegenläufige Reaktion der Transportaktivitäten bei Zugabe unterschiedlich geladener Lokalanästhetika vorhersagt.

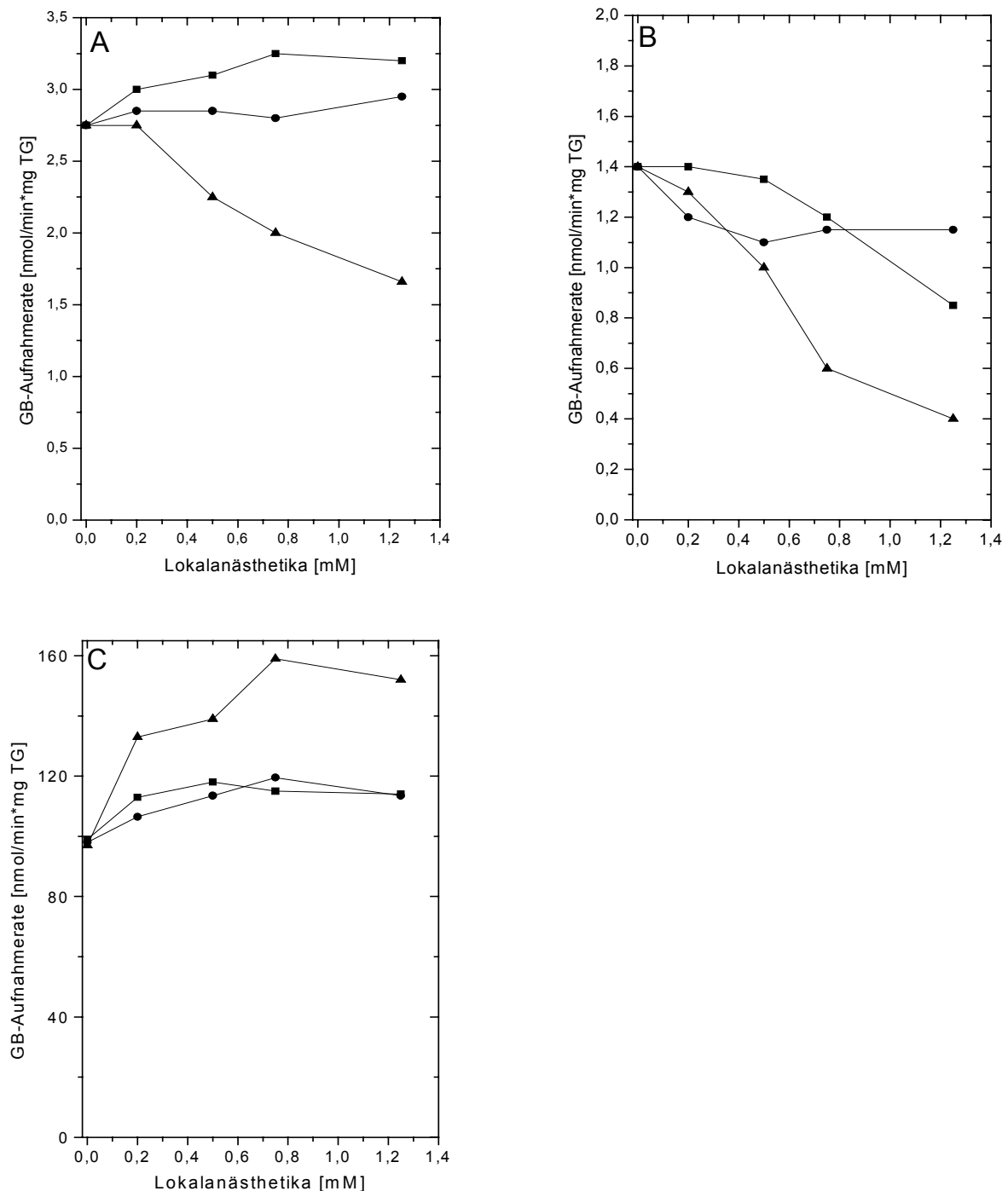


Abb. 19: Regulationsverhalten von LcoP (A), EctP (B) und BetP (C) bei Zugabe unterschiedlich geladener Lokalanästhetika. Die externe Osmolalität wurde durch die Zugabe von 450 mM NaCl eingestellt, sodass die einzelnen Proteine mindestens 30% ihrer maximalen Transportaktivitäten erreichten. Tetracain (positiv geladen; Dreiecke), Dekan (ohne Ladung; Kreise), Capronsäure (negativ geladen; Quadrate).

Um sicherzustellen, dass die hemmenden bzw. aktivierenden Effekte der Lokalanästhetika unabhängig von der osmotischen Voraktivierung der Transporter sind, wurden die Transportaktivitäten von EctP und BetP in Anwesenheit maximal wirksamer Lokalanästhetikum-Konzentrationen (1 mM) bestimmt, wobei die unterschiedlichen Osmolalitäten durch Zugabe von Sorbitol eingestellt wurden. Abbildung 20A fasst die Ergebnisse für EctP zusammen. Das positiv geladene Tetracain hemmte die Transportaktivität des EctP-Proteins vollständig (vergleiche auch Abbildung 19A), während das ungeladene Dekan keinen und die Capronsäure nur einen schwach inhibitorischen Einfluss auf die Aktivierbarkeit des Transporters hatte. Dies zeigt, dass die zuvor beobachteten hemmenden bzw. aktivierenden Effekte der Lokalanästhetika unabhängig von der osmotischen Voraktivierung der Transporter sind. Für BetP (Abbildung 20B) ergab sich ein qualitativ ähnliches Bild. Zwar unterstützten spezifische experimentelle Bedingungen, beispielsweise der Zusatz von 300 mM Sorbitol, einen stimulierenden Effekt der negativ geladenen Capronsäure auf die Aktivierbarkeit des BetP Proteins, es konnte jedoch in keinem Fall eine gegenläufige Reaktion, d.h. eine Aktivierung durch positive Ladungen bzw. eine Hemmung durch negative Ladungen, wie sie für OpuA beschrieben wurde, beobachtet werden. Überraschend war die Beobachtung, dass BetP auch ohne osmotische Voraktivierung aktiviert werden konnte.

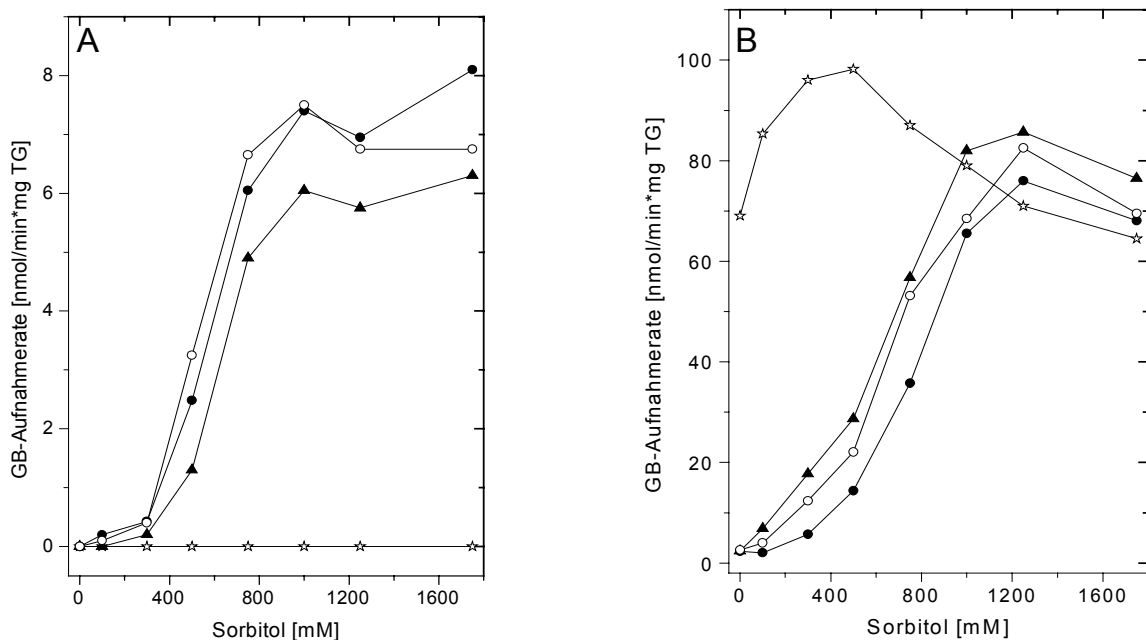


Abb. 20: Einfluss verschiedener Lokalanästhetika auf die osmotische Aktivierung von EctP und BetP. Der Einfluss unterschiedlich geladener Lokalanästhetika auf die Transportaktivität osmotisch regulierter Transporter wurde in den Stämmen DHPF/pEctP (A) und DHPF/pBetP (B) gemessen. Die externe Osmolalität wurde durch die Zugabe von Sorbitol variiert. Die Glycinbetain-Aufnahmeaktivität wurde in Abwesenheit (Kreise) oder Anwesenheit von 1 mM Tetracain (offene Sterne), 1 mM Dekan (Dreiecke) bzw. 1 mM Capronsäure (offene Kreise) bestimmt.

3.3 Reinigung von EctP nach Expression in *E.coli*

Die Experimente zur Glycinbetain-Aufnahme verkürzter EctP- und BetP-Varianten nach homologer Expression der Gene in *C. glutamicum* haben gezeigt, dass die terminalen Bereiche entscheidend an der Wahrnehmung und Aktivitätsregulation der Proteine unter hyperosmotischen Bedingungen beteiligt sind. N- bzw. C-terminale Verkürzungen führten bei beiden Proteinen zu identischen Regulationsmustern. Ein Erhalt der regulatorischen Eigenschaften bei einem wechselseitigen Austausch der Domänen war jedoch nicht zu beobachten. Durch die Synthese und Isolierung des EctP-Proteins wurden im Wesentlichen zwei Ziele verfolgt. Zum einen sollte es zur Herstellung spezifischer EctP-Antikörper eingesetzt werden, um die Synthese bzw. Membranintegration unterschiedlicher EctP-Varianten zu kontrollieren. Zum anderen sollte die Regulation der Glycinbetain-Aufnahme des isolierten Proteins im Proteoliposomensystem untersucht werden, um zu prüfen, ob EctP tatsächlich osmosensorische Eigenschaften besitzt, oder ob weitere Zellproteine an der Aktivitätsregulation beteiligt sind.

3.3.1 Heterologe Expression von *strep-ectP* in *E. coli* DH5 α

Zur Expression von *ectP* wurde der Vektor pASK-IBA5 verwendet. Das *ectP*-Gen ist in diesem Vektor an seinem 5'-Ende mit der kodierenden Sequenz des aus acht Aminosäuren bestehenden Peptids StrepII-tag fusioniert. pASK-IBA5 beinhaltet die Promotor/Operator Region des *tetA*-Resistenzgens, welche eine strikte Kontrolle der Proteinproduktion bei Induktion durch Anhydrotetracyclin (AHT) ermöglicht. Nach erfolgreicher Transformation von *E. coli* DH5 α und Kontrolle der DNA-Sequenzen der isolierten Plasmide konnte gezeigt werden, dass die korrekten Konstrukte vorlagen.

3.3.2 Synthese und Reinigung von Strep-EctP

Einzelkolonien von *E. coli* DH5 α /pASK-IBA5-*ectP* wurden in Flüssigkultur bei 37°C vermehrt und Wachstumskurven erstellt. Im Vergleich zu Kontrollkulturen, die den Vektor pASK-IBA5 enthielten, wuchsen die Zellen nach AHT-Induktion mit drastisch reduzierter Geschwindigkeit, was auf eine erfolgreiche Expression von *strep-ectP* hindeutete (Daten nicht gezeigt). Nach Aufschluss der Zellen war eine Strep-EctP Synthese weder in

Gesamtzellextrakten, noch in einzelnen subzellulären Fraktionen von *E. coli* DH5 α immunologisch nachweisbar. Die Synthese des Strep-EctP-Fusionsproteins konnte erst nach Isolierung der Membranproteine und anschließender affinitätschromatographischer Reinigung an StrepTactin-Sepharose nachgewiesen werden. Diese Reinigungsstrategie für Proteine mit fusioniertem StrepII-tag basiert auf hochaffinen, nicht kovalenten Wechselwirkungen zwischen den acht Aminosäureresten des StrepII-tags mit StrepTactin, welches an Sepharose immobilisiert vorliegt. Ein StrepII-tag-Fusionsprotein verbleibt am StrepTactin, während unspezifisch gebundene Proteine bei den folgenden stringenten Waschschrritten vom Säulenmaterial gelöst werden. Die Elution der Fusionsproteine erfolgt durch Zugabe von Desthiobiotin, welches mit dem StrepII-tag um die Interaktion mit StrepTactin konkurriert. Zudem ermöglicht das StrepII-Peptid einen immunologischen Nachweis mit Hilfe eines Streptavidin-AP-Konjugats. In Abbildung 21 ist die Reinigung von Strep-EctP, welches ein rechnerisches Molekulargewicht von ca. 66 kDa besitzt, dargestellt.

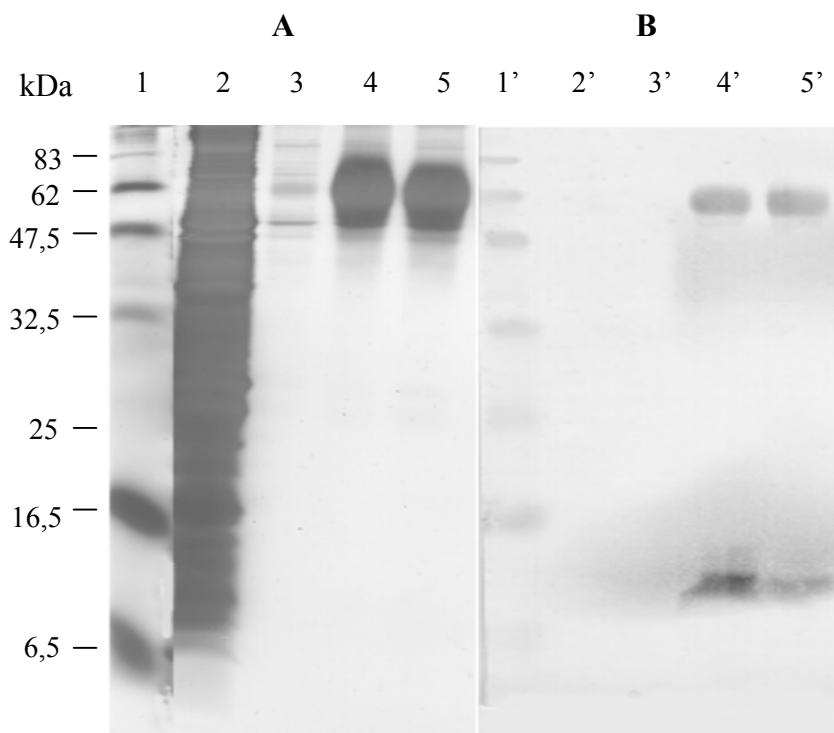


Abb. 21: Analyse der Strep-EctP-Reinigung. Zellen von *E. coli* DH5 α pASK-IBA5-*ectP* wurden 3 Stunden nach AHT-Induktion mit einer „Frech Press“ aufgeschlossen, die Membranfraktion isoliert und mit den solubilisierten Membranproteinen eine StrepTactin-Affinitätschromatographie durchgeführt. Der Nachweis der Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte durch Silberfärbung (A). Nach Transfer der Proteine auf eine Membran wurde ein Streptavidin-AP-Konjugat zum spezifischen Nachweis von Strep-EctP verwendet (B). (1, 1’): Proteinstandard; (2, 2’): Membranproteine (30 μ g); (3, 3’, 4, 4’, 5, 5’): Elutionsfraktionen 1- 3 (40 μ l jeder Fraktion).

Es ist zu erkennen, dass durch die StrepTactin-Affinitätschromatographie die Reinigung eines 62 kDa Proteins gelang (Spuren 4, 5). Durch die immunologische Analyse konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei diesem Protein um Strep-EctP handelt. Die Ausbeute lag mit weniger als 10 µg Strep-EctP/l Zellkultur jedoch weit unter den zur Rekonstitution bzw. Antikörperherstellung benötigten Mengen. Versuche, die Syntheserate von Strep-EctP durch Variation der Induktor-Konzentration oder der Induktionszeiten zu erhöhen, blieben ohne Erfolg. Auch eine schrittweise Herabsetzung der Kultivierungstemperatur bis auf 20°C, oder die Verwendung alternativer *E. coli* Stämme (*E. coli* BL21, *E. coli* JM109) führten nicht zu einer Verbesserung der Proteinausbeute (Daten nicht gezeigt).

3.3.3 Heterologe Expression von *gst-ectP* in *E. coli* BL21

Da die Reinigung des Step-EctP-Proteins in ausreichenden Mengen nicht gelang, sollte der Transporter als GST-Fusionsprotein (Glutathion-S-Transferase) synthetisiert werden. Dazu wurde *ectP* an seinem 5'-Ende mit der plasmidkodierten und unter der Kontrolle des *tac*-Promotors stehenden Sequenz der Glutathion-S-Transferase im Vektor pGEX3 ligiert. Das auf diese Weise entstandene Plasmid pGEX*ectP* wurde isoliert, zur Kontrolle sequenziert und in *E. coli* BL21 eingebracht.

3.3.4 Synthese von GST-EctP

Einzelkolonien von *E. coli* BL21/pGEX*ectP* und *E. coli* BL21/pGEX3 wurden in Flüssigkultur bei 25°C, 30°C und 37°C vermehrt und Wachstumskurven erstellt. Beide Stämme wuchsen nach Induktion mit IPTG mit identischen Geschwindigkeiten. Die immunologische Analyse der Gesamtzellextrakte ist in Abbildung 22 dargestellt. Sowohl in den Zellextrakten von *E. coli* BL21/pGEX*ectP* als auch im Kontrollstamm *E. coli* BL21/pGEX3, der nur das GST-Protein synthetisieren kann, erfolgte eine spezifische Kreuzreaktion der GST-spezifischen Antikörper mit der Glutathion-S-Transferase, deren aparentes Molekulargewicht 28 kDa beträgt. Eine Synthese von GST-EctP, dessen aparentes Molekulargewicht bei ca. 80-90 kDa liegen sollte, war hingegen nicht zu beobachten. Die Translation des GST-EctP-Proteins schien an der Fusionsstelle zwischen *gst* und *ectP* abubrechen.

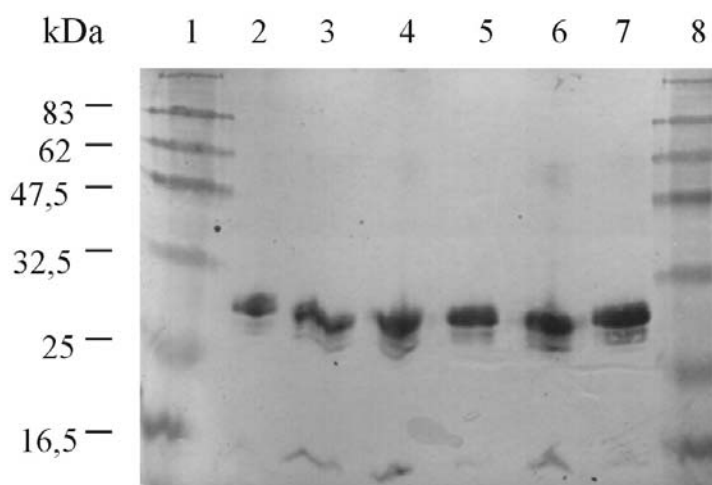


Abb. 22: Immunologischer Nachweis der GST-Synthese in *E. coli* BL21/pGEX3 und *E. coli* BL21/pGEXectP. Die Zellen wurden 3 Stunden nach Induktion geerntet und in der „French Press“ aufgeschlossen. Die Gesamtzellextrakte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Die Synthese der Glutathion-S-Transferase wurde mit einem GST-spezifischen Antikörper nachgewiesen. (1, 8): Proteinstandard; (2, 4, 6): *E. coli* BL21/pGEX3, Wachstum bei 25°C, 30°C und 37°C; (3, 5, 7): *E. coli* BL21/pGEXectP, Wachstum bei 25°C, 30°C und 37°C.

Um diesen unerwarteten Effekt genauer zu untersuchen, wurde zur Kontrolle der verwendeten Methode ein *gst-betP*-Fusionsgen konstruiert, da bekannt war, dass die Expression von BetP in *E. coli* prinzipiell möglich ist. Das *gst-betP*-Fusionsgen wurde in *E. coli* BL21 exprimiert und die Zellextrakte der GST-BetP synthetisierenden Zellen, immunologisch untersucht.

In Abbildung 23 ist zu erkennen, dass es in diesem Fall zu einer Synthese des GST-BetP-Fusionsproteins kam. Während bei den Zellextrakten der induzierten *E. coli* BL21/pGEXbetP-Zellen (Spuren 3-6) Kreuzreaktionen des GST-spezifischen Antikörpers mit Proteinaggregaten (Geltaschen 3-6) und Proteinen von ca. 83 kDa bzw. 170 kDa stattfanden, unterblieben diese bei der nichtinduzierten Kontrollkultur (Spur 1). Bei den nachgewiesenen Proteinen handelt es sich vermutlich um monomere, dimere und aggregierte Formen des GST-BetP-Fusionsproteins. Das GST-System ist demnach prinzipiell für die Synthese membranständiger Proteine geeignet, da sich GST-BetP erfolgreich und mit hoher Ausbeute isolieren lässt. Die Tatsache, dass EctP weder als StepII-tag-, noch als GST-Fusionsprotein in signifikanten Mengen synthetisiert wird, deutet auf eine toxische Wirkung des EctP-Proteins auf die *E. coli* Zellen hin, wobei es zu einem Translationsabbruch bzw. zu einem proteolytischen Abbau des Proteins zu kommen scheint.

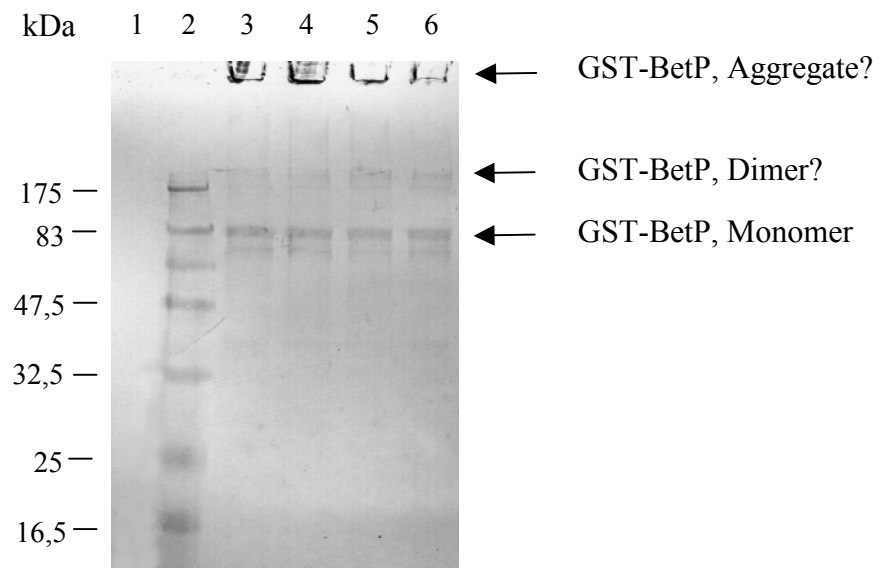


Abb. 23: Immunologischer Nachweis der GST-BetP Synthese in *E. coli* BL21/pGEXbetP. Zwei Einzelkolonien *E. coli* BL21/pGEXbetP wurden in Flüssigkultur bei 37°C vermehrt und die Synthese von GST-BetP mit 0,1 bzw. 0,5 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden nach dreistündigem Wachstum geerntet und in der „French Press“ aufgeschlossen. Die Gesamtzellextrakte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Die Synthese der GST-BetP-Fusionsproteine wurde mit einem GST-spezifischen Antikörper nachgewiesen. (1): Gesamtzellextrakt *E. coli* BL21/pGEXbetP, nicht induziert; (2): Proteinstandard; (3-6): Gesamtzellextrakte *E. coli* BL21/pGEXbetP.

3.4 Strukturelle Eigenschaften der C-terminalen Domäne von EctP

Die Ergebnisse zur Aktivitätsregulation C-terminal verkürzter EctP-Varianten ließen erkennen, dass die C-terminale Domäne des Proteins an der Wahrnehmung und/oder Integration osmotischer Signale beteiligt ist. Da EctP bei Verlust der Extension permanent aktiv ist, scheint ihre Funktion in der Inhibition der katalytischen Domäne bei Abwesenheit hyperosmotischer Bedingungen zu liegen. Detaillierte Aussagen über die Transduktion des osmotischen Signals zur katalytischen Domäne sind bisher jedoch nicht möglich.

CD-spektroskopische Untersuchungen zur Struktur der C-terminalen Domäne des nahe verwandten Transporters BetP zeigten, dass diese in wässriger Lösung unstrukturiert vorliegt und Wechselwirkungen mit hydrophoben Oberflächen das Peptid in eine α -helikale Struktur zwingen. Die Anwendung der „Resonant-Mirror-Spektroskopie“ ergab Hinweise, dass diese hydrophoben Interaktionen durch die Anwesenheit hoher Kalium-Konzentration gestört werden (Burger, 2002). Durch Kombination der strukturellen Informationen mit detaillierten

Kenntnissen zur Aktivierung des Proteins, wurde folgendes Regulationsmodell zur Aktivierung von BetP aufgestellt: In Abwesenheit von osmotischem Stress interagiert die C-terminale Domäne von BetP unter Ausbildung einer α -helikalen Struktur mit der Oberfläche der Cytoplasmamembran. Nach einem hyperosmotischen Schock kommt es zu einer Verringerung des Cytoplasmavolumens und damit zu einem Anstieg der zellinternen Kalium-Konzentration, welche von BetP detektiert wird. Dabei werden die Wechselwirkungen zwischen der C-terminalen Domäne und der Cytoplasmamembran gestört und der Transporter wird aktiviert (Burger, 2002; Rübenhagen *et al.*, 2001). Um festzustellen, ob dieses Modell auch auf die Regulation von EctP zutrifft, sollte die C-terminale Domäne des Proteins gereinigt und CD-spektroskopisch untersucht werden.

3.4.1 Heterologe Expression der C-terminalen EctP-Domäne in *E. coli* BL21

Die für die C-terminale Domäne von EctP kodierende Sequenz wurde mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pGEX3 ligiert, wobei ihr 5'-Ende mit der plasmidkodierten Sequenz der Glutathion-S-Transferase fusioniert vorlag. Nach Verifizierung der korrekten Sequenz des auf diese Weise entstandenen Plasmids pGEX $cectP$ erfolgte die Transformation in *E. coli* BL21.

3.4.2 Synthese von GST-CEctP in *E. coli* BL21

Drei Klone von *E. coli* BL21/pGEX $cectP$ wurden in Flüssigkultur bei 37°C vermehrt. Nach dreistündiger Induktion mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen wurden die Zellextrakte hinsichtlich der Synthese von GST-CEctP analysiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Zellextrakte und Färbung mit Commassie-Blau (Abbildung 24A) war bei den *E. coli* BL21/pGEX $cectP$ -Klonen die Produktion eines Proteins der erwarteten Masse von ca. 45 kDa nachzuweisen (Spuren 2-4 und 6-8), welches im Zellextrakt des Kontrollstammes *E. coli* BL21/pGEX3 (Spur 1) fehlte. Immunologische Studien (Abbildung 24B) zeigten, dass es sich bei dem Protein um das GST-CEctP-Fusionsprotein handelte. Die Variationen der Induktor-Konzentrationen zwischen 0,1 und 0,5 mM hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Syntheserate. Durch differentielle Zentrifugation der Zellextrakte konnte nachgewiesen werden, dass GST-CEctP in löslicher Form synthetisiert wird (Daten nicht gezeigt). Eine

Assoziation mit Membranbestandteilen war nicht zu beobachten.

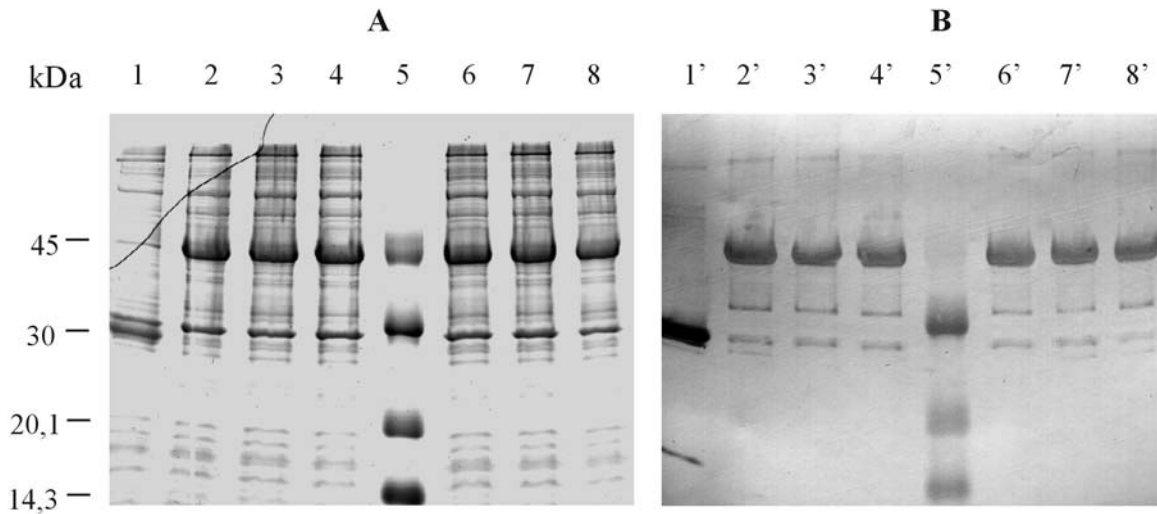


Abb. 24: Analyse der GST-CEctP-Synthese in *E. coli* BL21/pGEXcetP. Die Zellen wurden in Flüssigmedium bei 37°C vermehrt, 3 Stunden nach Induktion geerntet und in der „French Press“ aufgeschlossen. Die Gesamtzellextrakte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Comassie-Blau gefärbt (**A**) bzw. nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf eine Membran übertragen (**B**). Der immunologische Nachweis der GST erfolgte mit einem GST-spezifischen Antikörper. (1, 1’): Gesamtzellextrakt *E. coli* BL21/pGEX3; (2-4; 2’-4’): Zellextrakte der drei *E. coli* BL21/pGEXcetp Kulturen, induziert mit 0,1 mM IPTG; (6-8; 6’-8’): Zellextrakte der drei *E. coli* BL21/pGEXcetp Kulturen, induziert mit 0,5 mM IPTG; (5, 5’): Proteinstandard

3.4.3 Reinigung von GST-CEctP

Die Reinigung des GST-CEctP-Fusionsproteins sollte affinitätschromatographisch erfolgen. Die Reinigungsstrategie beruht auf der hochaffinen Bindung der Glutathion-S-Transferase an immobilisiertes Glutathion. Das GST-CEctP-Fusionsprotein verbleibt bei den folgenden stringenten Waschschritten am Affinitätsmedium, während andere Proteine durch stringente Waschschritte vom Säulenmaterial gelöst werden. Unter Verwendung des Faktors Xa, welcher das Fusionsprotein zwischen der GST und der C-terminalen EctP Domäne proteolytisch spaltet, erfolgt die Freisetzung der EctP-Extension vom Säulenmaterial. Das Ablösen der GST erfolgt anschließend durch Elution mit einem Überschuss reduzierten Glutathions, welches mit dem immobilisierten Glutathion um die Bindung der GST konkurriert. Das Ergebnis der CEctP-Reinigung nach gelelektrophoretischen und immunologischen Analysen der erhaltenen Fraktionen ist in Abbildung 25 gezeigt. Der

Säulendurchlauf enthielt signifikante Mengen des GST-CEctP-Fusionsproteins, da die Bindungskapazität des Affinitätsmediums überschritten wurde (Spur 1,1'). Im Überstand (nach proteolytischer Spaltung durch den Faktor Xa) fand sich hauptsächlich ein Protein mit einem aparenten Molekulargewicht von 28 kDa (Spur 2). Der immunologische Nachweis zeigte, dass es sich hierbei nicht um die Glutathion-S-Transferase handeln konnte. Diese fand sich ausschließlich in den Elutionsfraktionen. (Spuren 4, 4', 5, 5'). Massenspektroskopische Analysen und die endterminale Anequenzierung durch Edmann-Abbau (Schmid, Universität Osnabrück) erbrachten schließlich den Beweis, dass es sich bei dem dominanten Protein in Spur 2 um die C-terminale Domäne von EctP handelte, deren rechnerisches Molekulargewicht 12,3 kDa beträgt. Das ungewöhnliche Laufverhalten der Domäne, wurde bereits in früheren Reinigungsversuchen, nach Synthese in einem *in vitro*-Translationssystem beobachtet (Morbach, persönliche Mitteilung). Die Ausbeute der gereinigten C-terminalen Extension lag bei ca. 2,3 mg/l Zellkultur. Damit stand ausreichend Protein für die im Folgenden durchgeführten CD-spektroskopischen Untersuchungen zur Verfügung.

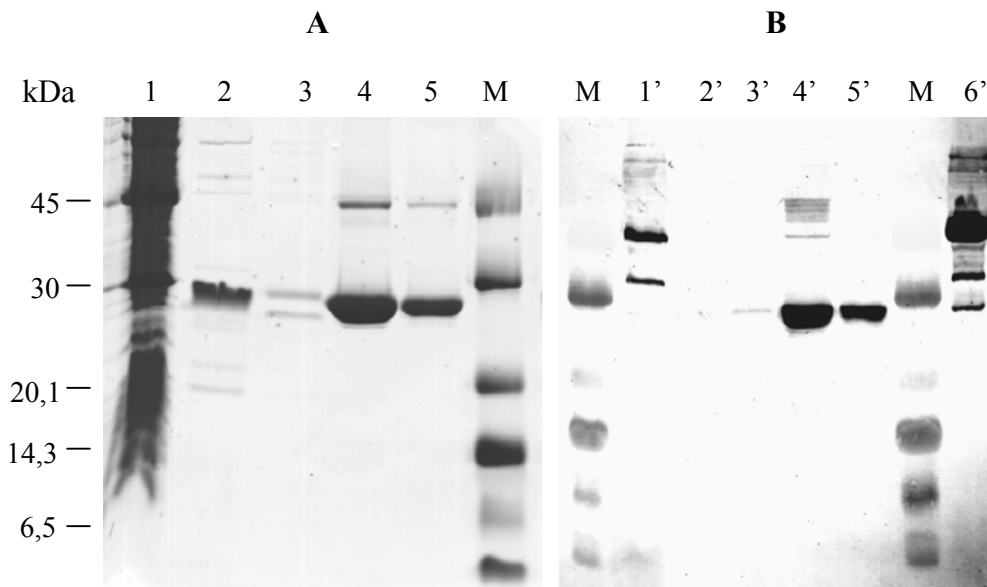


Abb. 25: Analyse der CEctP-Reinigung. Die Zellen wurden 3 Stunden nach Induktion mit IPTG geerntet und in der „French Press“ aufgeschlossen. Durch differentielle Zentrifugation wurden lösliche von unlöslichen Zellbestandteilen getrennt. Die einzelnen Fraktionen der anschließenden Reinigung wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, mit Comassie-Blau gefärbt (A) bzw. auf eine Membran übertragen und unter Verwendung des GST-Antikörpers immunologisch analysiert (B). (1, 1'): Säulendurchlauf; (2, 2'): Überstand nach Proteolyse durch Faktor Xa; (3, 3'): Waschfraktion; (4, 4', 5, 5'): Elutionsfraktionen (6'): Gesamtzellextrakt *E. coli* BL21/pGEX $cectP$; (M): Proteinstandard

3.4.4 CD-spektroskopische Untersuchung der C-terminalen EctP-Domäne

Die CD-Spektroskopie erlaubt Aussagen über den Anteil von Sekundärstrukturelementen innerhalb eines Proteins bzw. Peptids, da die verschiedenen Sekundärstrukturen aufgrund unterschiedlicher Wechselwirkung mit links- und rechts-zirkularisiertem Licht, charakteristische CD-Spektren aufweisen (Abbildung 4). Um die Fähigkeit der C-terminalen EctP-Domäne zur Strukturausbildung zu untersuchen, wurden CD-Spektren des Peptids in H_2O , 200 mM KCl, 200 mM NaCl bzw. bei Anwesenheit von SDS-Mizellen (9 mg/ml) aufgenommen. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 26 dargestellt.

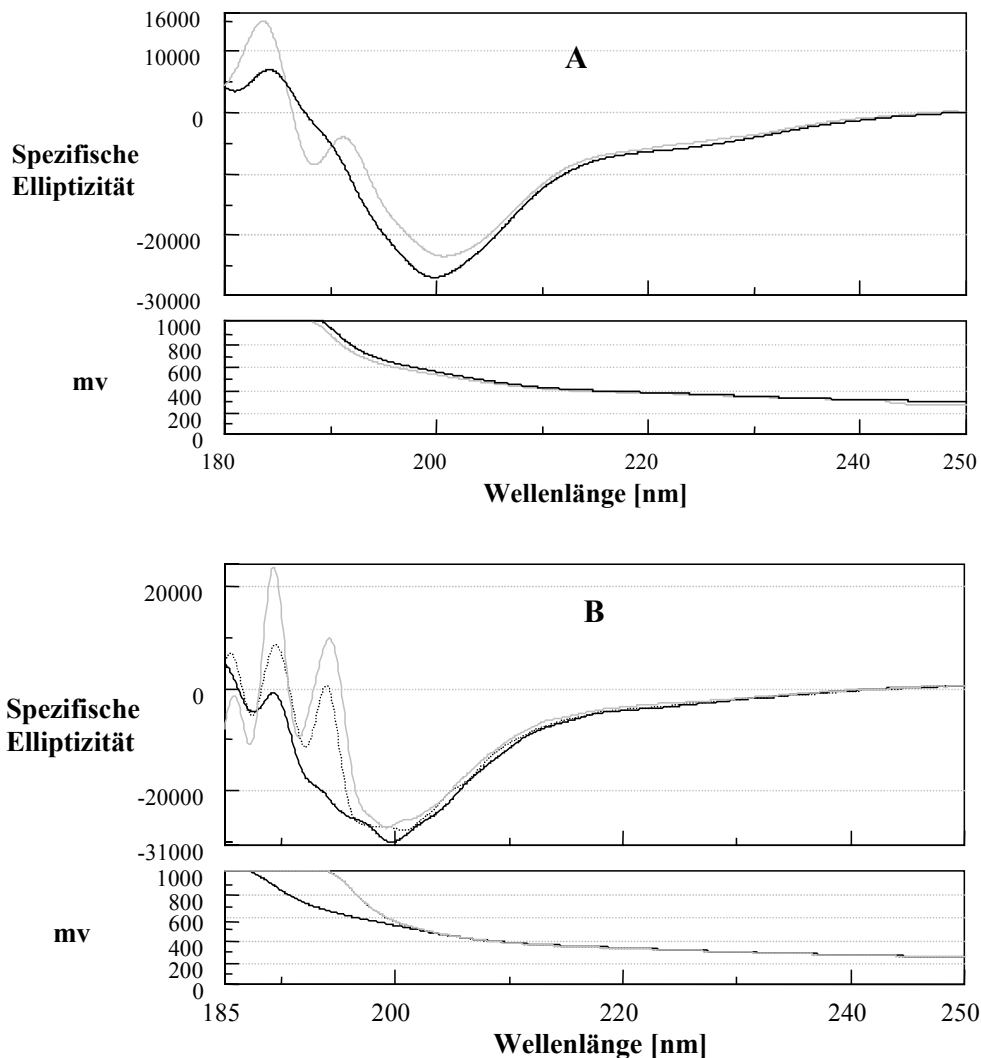


Abb. 26: CD-spektroskopische Untersuchung der C-terminalen EctP-Domäne. (A) CD-Spektrum in H_2O (schwarze Linie), CD-Spektrum in Anwesenheit von 9 mg/ml SDS (graue Linie). (B) CD-Spektrum in H_2O (schwarze Linie), CD-Spektrum in Anwesenheit von 200 mM KCl (graue Linie) bzw. 200 mM NaCl (gestrichelte Linie).

Die Induktion α -helikaler bzw. β -Faltblatt Strukturen, welche durch das Auftreten charakteristischer Minima bei 208 nm und 220 nm oder im zweiten Fall durch ein Maximum bei 200 nm gekennzeichnet wären (Chen *et al.*, 1972, Gans *et al.*, 1991), war weder bei Erhöhung der Ionenstärke durch KCl oder NaCl, noch bei Anwesenheit von SDS-Mizellen zu beobachten. Alle CD-Spektren zeigten starke Minima bei einer Wellenlänge von 200 nm, welche typisch für ungefaltete Proteine sind.

4 Diskussion

Zum Schutz vor rasch auftretenden hyperosmotischen Bedingungen akkumuliert *C. glutamicum* intrazellulär kompatible Solute. Bei externer Verfügbarkeit werden diese bevorzugt aus dem Medium rekrutiert. Zu diesem Zweck besitzt das Bakterium mit BetP (Peter *et al.*, 1996), ProP, EctP (Peter *et al.*, 1998b) und LcoP (diese Arbeit) vier osmotisch regulierte, sekundäre Transportsysteme, welche sich hinsichtlich ihrer Substratspektren und Transportkapazitäten deutlich voneinander unterscheiden. Drei der Transporter, BetP, EctP und das in dieser Arbeit charakterisierte Transportsystem LcoP gehören zur Familie der BCCT-Proteine (Betain/Carnitin/Cholin-Transporter), bei deren Mitgliedern es sich um Na⁺-Symporter handelt (Saier *et al.*, 1999). *In vivo* Analysen des osmosensitiven Transporters BetP haben gezeigt, dass dessen cytoplasmatisch lokalisierte, N- und C-terminale Domänen an der Wahrnehmung und/oder der Weiterleitung eines osmotischen Signals an die katalytische Domäne des Proteins beteiligt sind (Peter *et al.*, 1998a). Durch die Verwendung des Proteoliposomensystems gelang es, die Erhöhung der internen K⁺-Konzentration als einen entscheidenden osmotischen Reiz für die Aktivierung des Proteins zu identifizieren (Rübenhagen *et al.*, 2001). Andere Untersuchungen mit BetP-Proteoliposomen belegten einen signifikanten Einfluss der Membrenumgebung auf die Aktivierbarkeit des Transporters (Rübenhagen *et al.*, 2000). Die detaillierten Kenntnisse zur Regulation von BetP und die Anwesenheit weiterer osmotisch regulierter BCCT-Transportsysteme in *C. glutamicum*, im speziellen die Verfügbarkeit des Proteins EctP (Peter *et al.*, 1998b), bildeten die Grundlage der vorliegenden vergleichenden Studie über die Mechanismen der Osmoregulation sekundärer Transportsysteme.

4.1 Das Glycinbetain/Ectoin-Aufnahmesystem LcoP

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit bestand in der Konstruktion eines für kompatible Solute aufnahmedefekten *C. glutamicum*-Stammes, welcher in der Folge eine detaillierte Regulationsanalyse verschiedener plasmidkodierter EctP-Mutanten ermöglichen sollte. Mit *C. glutamicum* DHPE ($\Delta betP$, $\Delta proP$, $\Delta putP$, $\Delta ectP$) stand zwar ein Stamm zu Verfügung bei dem keine Prolin- und Ectoin-Aufnahme mehr nachzuweisen war, der jedoch weiterhin eine schwache Glycinbetain-Aufnahme zeigte (Peter *et al.*, 1996). Die biochemische Analyse der verbliebenen Glycinbetain-Aufnahmeaktivität des Stammes DHPE zeigte, dass diese

osmotisch reguliert ist (Abbildung 5). Datenbankrecherchen ermöglichten die Identifizierung eines offenen Leserasters, welches ein integrales Membranprotein mit cytoplasmatisch lokalisierten Domänen kodiert. Das abgeleitete Protein besitzt mit 12 vorhergesagten, konservierten Transmembransegmenten, die durch hydrophile Schleifen miteinander verbunden sind, eine für Transportproteine übliche Topologie (Henderson und Maiden, 1989). Die Aminosäuresequenz des Transmembranbereichs weist hohe Identitäten zu Proteinen der BCCT-Familie auf, während sich im Bereich der terminalen Domänen keine signifikanten Ähnlichkeiten zu anderen Mitgliedern der BCCT-Familie ergeben. Lediglich die C-terminale Domäne des Proteins zeigt mit einer Nettoladung von -16 und einer Länge von 101 Aminosäuren geringe Ähnlichkeiten zur entsprechenden EctP-Domäne (Nettoladung -13, 108 Aminosäuren).

Die erfolgreiche Deletion des offenen Leserasters im Genom von *C. glutamicum* DHPE ($\Delta betP$, $\Delta proP$, $\Delta putP$, $\Delta ectP$), führte zum Stamm, *C. glutamicum* DHPF ($\Delta betP$, $\Delta proP$, $\Delta putP$, $\Delta ectP$, $\Delta lcoP$), welcher nicht mehr in der Lage war Glycinbetain aufzunehmen (Abbildung 8). Zum einen war somit der Nachweis erbracht, dass es sich bei dem kodierten Protein, welches LcoP („low capacity osmoregulated permease“) genannt wurde, tatsächlich um einen weiteren osmotisch regulierten Glycinbetain-Transporter handelt. Zum anderen erfüllte der Stamm DHPF die gewünschten Voraussetzungen zur Analyse der EctP-Regulation und zur Charakterisierung des entdeckten Transporters. Die detaillierte biochemische Charakterisierung von LcoP nach Expression des kodierenden Gens im homologen System *C. glutamicum* DHPF zeigte, dass es sich bei LcoP um ein Na^+ -abhängiges, osmotisch reguliertes Aufnahmesystem für Glycinbetain und Ectoin handelt (Abbildung 9). Nach heterologer Expression von *lcoP* in der aufnahmedefekten *E. coli* Mutante MKH13 konnte hingegen keine Transportfunktion der Permease nachgewiesen werden. Gleiches wurde für EctP beobachtet. Als Ursachen kommen sowohl unzureichende Genexpression, als auch Inaktivität oder proteolytischer Abbau der Proteine in Betracht. Da in beiden Fällen die Genexpression durch Zugabe von IPTG kontrolliert induziert wurde und eine Häufung seltener Kodons, welche zu verringerten Expressionsraten führen kann (Eikmanns, 1992), nicht feststellbar war, scheint ein proteolytischer Abbau bzw. eine inaktive Konformation der Transporter in *E. coli* vorzuliegen.

Obwohl die maximalen Glycinbetain-Transportraten des chromosomal kodierten LcoP-Proteins im Stamm *C. glutamicum* DHPE sehr gering waren (Abbildung 5), konnte die physiologische Bedeutung des Transporters durch Wachstumsversuche mit den Stämmen DHPF und DHPE verdeutlicht werden. Bei Abwesenheit weiterer Transportsysteme für

kompatible Solute vermittelte LcoP den Zellen unter hyperosmotischen Bedingungen in Anwesenheit externen Glycinbetains signifikante Wachstumsvorteile (Abbildung 10). Ein qualitativ ähnliches Szenario ergibt sich für den Wildtyp Stamm *C. glutamicum* ATCC 13032, wenn unter schwach hyperosmotischen Bedingungen ausschließlich externes Ectoin als kompatibles Solut zur Verfügung steht. Unter derartigen Bedingungen katalysieren nur LcoP und EctP die Aufnahme von Ectoin. BetP und ProP sind aufgrund ihres Substratspektrums hierzu nicht in der Lage. Da LcoP sein Aktivitätsoptimum bei deutlich geringeren Osmolalitäten erreicht als EctP, sollte den Zellen eine flexiblere osmotische Adaptation und damit schnelleres Wachstum möglich sein. Wie das Wachstum von *C. glutamicum* DHPF belegt, ist LcoP keinesfalls essentiell für das Überleben der Zellen nach einem hyperosmotischen Schock. Vielmehr scheint der Transporter Teil des komplexen, osmoprotektiven Systems von *C. glutamicum* zu sein. Dieses beinhaltet neben sekundären Transportern, deren Aktivitäten osmotisch reguliert sind, auch eine erst ansatzweise verstandene Transkriptionsregulation der kodierenden Gene (Morbach, persönliche Mitteilung). In Kombination mit der Fähigkeit zur *de novo* Synthese der kompatiblen Solute Prolin und Trehalose ermöglicht ein Set osmotisch regulierter Transportproteine, wie es durch LcoP, EctP, BetP und ProP gegeben ist, eine optimale, schnelle Adaptation an unterschiedlichste hyperosmotische Gegebenheiten. Ein derartig komplexes Zusammenspiel ist auch für andere Bakterien, wie z.B. *B. subtilis* oder *E. coli* (Überblick in Wood, 1999; Bremer und Krämer 2000; Morbach und Krämer, 2002) beschrieben worden und unterstreicht die Bedeutung der Anpassungsfähigkeit an wechselhafte, osmotische Bedingungen.

Die geringen Aufnahmeraten von LcoP unter hyperosmotischen Bedingungen führten zu der Frage, ob das Protein neben der Beteiligung an der osmotischen Adaptation weitere physiologische Aufgaben erfüllt. Gerhardt *et al.* (2000) beobachteten, dass der osmotisch regulierte ABC-Transporter „Glycine betaine Porter II“ aus *L. monocytogenes* auch durch Kältestress aktivierbar ist. Während die osmotische Aktivierung von einem osmotischen Gradienten abhängt, scheint die Kälteaktivierung von „Glycine betaine Porter II“ auf Veränderungen in der Membranfluidität zurückzugehen.

Im Rahmen der LcoP Charakterisierung wurde daher untersucht, ob auch die BCCT-Transporter aus *C. glutamicum* einem solchen Aktivierungsmechanismus unterliegen. Während dieses für EctP und LcoP nicht der Fall war, konnte für BetP überraschenderweise eine signifikante Aktivierung durch Kälte nachgewiesen werden (Abbildung 11). Diese Beobachtung ist besonders interessant, da über die Signale, welche zur Aktivierung von BetP *in vivo* führen, wenig bekannt ist. Bisherige Erkenntnisse beruhen auf Untersuchungen des

isolierten Proteins im Proteoliposomensystem. Dabei konnte gezeigt werden, dass BetP in Proteoliposomen durch hohe interne K^+ -Konzentrationen aktiviert wird (Rübenhagen *et al.*, 2001). Es erscheint einleuchtend, dass eine Erhöhung der internen K^+ -Konzentration als Folge hyperosmotischer Bedingungen auch in der Bakterienzelle zur Aktivierung von BetP beiträgt. Eine plausible Erklärung für die beobachtete Kälteaktivierung des Proteins bietet diese Annahme jedoch nicht, da es bisher keine Hinweise auf eine K^+ -Akkumulation in Bakterien nach einem Kälteschock gibt. Demzufolge muss davon ausgegangen werden, dass BetP neben einer K^+ -Aktivierung weiteren stressbedingten Aktivierungsmechanismen unterliegt. Hierfür spricht auch der Befund, dass das Aktivierungsverhalten von BetP durch eine veränderte Membranzusammensetzung, welche unter anderem die Membranspannung und Fluidität der Phospholipidschicht verändert, moduliert wird (Rübenhagen *et al.*, 2000). Daher darf über eine Aktivierung von BetP durch Änderungen in der Membranfluidität, wie sie von Gerhardt *et al.* (2000) für den „Glycine betaine porter II“ vorgeschlagen wurde, spekuliert werden. Hierbei sei auch auf die Studien zur Aktivierbarkeit der BCCT-Transporter durch unterschiedlich geladene Lokalanästhetika, welche im Abschnitt 4.3 ausführlich diskutiert wird, verwiesen.

4.2 Funktionen der terminalen Domänen von EctP

Die erfolgreiche Herstellung der transportdefizienten *C. glutamicum*-Mutante DHPF ermöglichte die Untersuchung der Aktivitätsregulation von EctP. Da bekannt war, dass die terminalen Domänen von BetP entscheidend an der Aktivitätsregulation beteiligt sind (Peter *et al.*, 1998a), wurden Deletionsmutanten von *ectP* konstruiert, die für terminal verkürzte EctP-Proteine kodierten. Die funktionelle Charakterisierung erfolgte nach deren Synthese im Stamm DHPF (Abbildung 13). Die Verkürzungen der N- bzw. C-terminalen Domäne führten zu charakteristischen Veränderungen in der Aktivitätsregulation des Proteins und zeigten dabei interessanterweise Effekte, welche in identischer Form bei BetP beobachtet wurden. Im Fall von BetP führte die Entfernung von 23 (Peter *et al.*, 1998a) bzw. von 45 Aminosäureresten (diese Studie) der aus insgesamt 55 Aminosäuren bestehenden, positiv geladenen Domäne zu einem permanent aktiven Transporter, also zum Verlust der regulatorischen und sensorischen Eigenschaften des Proteins, die auch als Deregulation bezeichnet wird. Ein identisches Bild ergab sich bei der Entfernung von 106 Aminosäureresten der ca. doppelt so langen, negativ geladenen C-terminalen Domäne von

EctP (108 Aminosäuren). Das Protein EctPC Δ 106 war wie BetPC Δ 45 vollständig dereguliert. Auch die Effekte bei C-terminalem Verlust von 12 Aminosäureresten bei BetP bzw. 30 Aminosäuren bei EctP, was in beiden Fällen einer Verkürzung um ca. 25 % entspricht, waren identisch. Beide Proteine waren in Abwesenheit von hyperosmotischen Bedingungen signifikant aktiv, reagierten jedoch weiterhin mit Aktivitätssteigerungen auf Erhöhung der externen Osmolalität (Peter *et al.*, 1998a., Abbildung 13). Diese Ergebnisse lassen sich folgendermaßen erklären: Die C-terminalen Domänen von EctP und BetP beinhalten zwei, Funktionen. Eine regulatorische Funktion, die bereits bei partiellem Verlust von ca. 25% der Domäne eingeschränkt ist und eine sensorische Funktion, welche erst bei massiv verkürzter C-terminaler Domäne verloren geht. Da die katalytische Aktivität auch bei nahezu vollständiger Entfernung der C-terminalen Domänen (EctPC Δ 106, BetPC Δ 45) erhalten blieb, muss die regulatorische Funktion in der Inhibition der Transportaktivitäten in Abwesenheit hyperosmotischer Bedingungen bestehen. Bisher war man von einer aktivierenden Funktion der C-terminalen BetP-Domäne ausgegangen, da eine BetP Δ 52-Variante (Peter *et al.*, 1998a) keine katalytische Aktivität mehr aufwies. Auch die Funktion der N-terminalen Domänen erwies sich bei beiden Proteinen als sehr ähnlich. Sowohl bei EctP (Abbildung 13) als auch bei BetP (Peter *et al.*, 1998a) führte der Verlust der N-terminalen Domäne zur Verschiebung des Aktivitätsoptimums zu höheren Osmolalitäten, was mit einer Abnahme der Sensitivität gegenüber hyperosmotischem Stress gleichzusetzen ist. Die strikte Osmoregulation, welche sich in der vollständigen Inaktivierung der Transporter bei fehlendem hyperosmotischen Stress zeigt, blieb hingegen vollständig erhalten. Demzufolge ist die Funktionsweise der N- und der C-terminalen Domäne innerhalb eines Proteins genau gegenläufig. Die N-terminale Domäne unterstützt die Aktivierung bei hyperosmotischem Stress, während die C-terminale Domäne eine Aktivierung in Abwesenheit von hyperosmotischem Stress inhibiert. Innerhalb der BCCT-Familie erfüllen N- und C-terminale Domänen jedoch identische Funktionen.

Neben den Ähnlichkeiten hinsichtlich ihren regulatorischen Funktionen ergaben die Untersuchungen der verkürzten Protein-Varianten weitere auffallende Übereinstimmungen. C-terminal verkürzte BetP-Proteine wiesen eine deutliche Abnahme in der Affinität zu ihrem Co-Substrat Na⁺ auf (Peter *et al.*, 1998a). Identische Ergebnisse wurden in dieser Studie für C-terminal verkürzte EctP-Varianten erhalten. Die Affinität für Na⁺ nahm proportional mit der Länge der C-terminalen Domäne ab (Abbildung 14, Tabelle 7). Da EctP und BetP auch bei vollständigem Verlust der C-terminalen Domäne (EctPC Δ 106, BetPC Δ 45) katalytisch aktiv waren, kann eine direkte Beteiligung dieser Domäne an der Na⁺-Bindung wie sie bisher diskutiert wurde (Peter *et al.*, 1998a) ausgeschlossen werden. Die C-terminalen Verkürzungen

scheinen vielmehr Konformationsänderungen in zentraleren Proteinbereichen hervorzurufen, welche letztlich zu den erniedrigten Na⁺-Affinitäten führen.

Die Feststellung, dass die terminalen Domänen von EctP und BetP identische funktionelle Eigenschaften besitzen, ist aus verschiedenen Gründen besonders interessant. Zum einen verdeutlicht sie die Wichtigkeit terminaler Domänen für die Osmoregulation von Transportern der BCCT-Familie, was auch durch die Beobachtung belegt wird, dass alle osmoregulierten Mitglieder dieser Protein-Familie eine C-terminale Domäne signifikanter Länge (> 26 Aminosäuren) besitzen. Osmotisch nicht regulierte Mitglieder wie z.B. CaiT aus *E. coli* (Verheul *et al.*, 1998) weisen hingegen keine C-terminale Domäne auf. Weitere wichtige Hinweise auf die essentielle Bedeutung terminaler Domänen an der Regulation osmotisch aktivierter Transporter ergaben Untersuchungen an Transportsystemen anderer Protein-Familien. ProP aus *E. coli*, ein Mitglied der MFS-Familie („major facilitator superfamily“) besitzt eine cytoplasmatisch lokalisierte C-terminale Domäne. *In vitro* Studien mit isolierten Peptiden der C-terminalen Domäne belegten, dass sie eine homodimere, α -helikale „coiled-coil“ Struktur ausbilden kann. ProP-Varianten, die nicht in der Lage waren diese Struktur zu bilden, zeigten ein stark verändertes Regulationsverhalten bei hyperosmotischem Stress (Culham *et al.*, 2000). Die osmotische Regulation von Fps1, dem Glycerin Facilitator aus *Saccharomyces cerevisiae* und Mitglied der MIP-Familie („major intrinsic protein“) ist Abhängig von der Anwesenheit der N-terminalen Domäne (Tamas *et al.*, 1999). Auf der anderen Seite ist mit dem ABC-Transporter OpuA aus *Lactococcus lactis* ein osmosensorisches Transportsystem bekannt, das keine terminalen Domänen besitzt (Van der Heide und Poolman, 2000). ABC-Transporter haben nachweislich keine nennenswerten strukturellen Gemeinsamkeiten mit sekundären Transportern, jedoch schließt die Tatsache, dass Osmoregulation auch ohne terminale Domänen bewerkstelligt werden kann, die Vorhersage eines generellen Osmosensing-Mechanismus unter Beteiligung terminaler cytoplasmatischer Domänen aus.

Basierend auf der Feststellung, dass sich die terminalen Domänen der BCCT-Proteine funktionell sehr ähnlich sind, sollte untersucht werden, in wie weit sich die Domänen bei einem wechselseitigen Austausch funktionell ersetzen können. Zu diesem Zweck wurde ein vollständiger Satz chimärer EctP/BetP-Proteine durch Kombination der vier terminalen Domänen mit den beiden zentralen Bereichen der Proteine hergestellt (Abbildung 15). Özcan *et al.*, (1998) gelang es in einer vergleichbaren Studie, die sensorische Funktion der Glukose-Sensoren Snf3 und Rgt2, durch die Fusion der C-terminalen Domänen mit den Glukose-Transportern HXT1 und HXT2, welche normalerweise keine Glukose-Sensoren

darstellen, auf letztere zu übertragen. Auch in der vorliegenden Studie konnte ein chimäres Protein identifiziert werden (BetPNE), welches wie das ursprüngliche BetP-Protein eine osmosensorische Funktion besaß (Abbildung 16). Der zusätzliche Austausch der C-terminalen Domäne bei BetPNCE zeigte jedoch, dass die beobachtete Aktivierung nicht auf die fusionierte N-terminale Domäne von EctP zurückzuführen ist, da diese Mutante zwar aktiv, jedoch nicht mehr osmotisch reguliert war. Die Regulation von BetPNE spiegelt vielmehr die sensorische Funktion der nativen C-terminalen Domäne von BetP wieder. Die Feststellung, dass alle Chimären bei denen die C-terminale Domäne ausgetauscht wurde dereguliert (EctPCB, BetPNCE) oder inaktiv (EctPNCB, BetPCE) waren, lässt vermuten, dass spezifische Interaktionen zwischen C-terminaler Domäne und dem zugehörigen, zentralen Proteinbereich zur Regulation nötig sind bzw., dass die intrinsische Signalweiterleitung von den heterologen Domänen zum zentralen Bereich der Chimären gestört ist. Die Deregulation der Chimären EctPCB und BetPNCE ist daher offensichtlich eine Konsequenz der fehlenden, nativen, osmosensorischen Domäne. Hinweise auf eine partielle Komplementation der Funktion konnten beim Austausch der N-terminalen Domänen erhalten werden, denn EctP/BetP-Chimären waren nur aktiv, wenn sie die N-terminale Domäne von EctP trugen (EctPCB BetPNE, BetPNCE). Diese Feststellung stimmt sehr gut mit den Ergebnissen des Vergleichs der doppelt verkürzten EctP- (EctPN Δ 23CA30) und BetP-Proteine (BetPN0C2, Peter *et al.*, 1998a) überein. Dabei zeigte sich, dass die N-terminale Domäne von EctP einen viel stärkeren Einfluss auf die Aktivierbarkeit des Proteins besitzt als dieses bei der N-terminalen Domäne von BetP der Fall ist. Während bei EctP eine N-terminale Verkürzung über eine C-terminale dominierte, was sich durch eine strikte Regulation bei gleichzeitiger Verschiebung des Aktivitätsoptimums zu höheren Osmolalitäten zeigt (Abbildung 13D), verhielt sich BetPN0C2 wie die entsprechende C-terminal verkürzte Mutante BetPC2 (Peter *et al.*, 1998a). Demzufolge könnte die N-terminale EctP Domäne, beziehungsweise ihr starker, aktivierender Einfluss, Voraussetzung für die Transportaktivität chimärer EctP/BetP-Proteine sein. Diese Schlussfolgerung setzt jedoch voraus, dass die Inaktivität der Chimären BetPCE, EctPNB und EctPNCB auf einer unzureichenden Aktivierbarkeit der Proteine durch die nur schwach aktivierende C-terminale Domäne von BetP beruht. Es muss jedoch bedacht werden, dass die Inaktivität dieser Chimären auch andere Ursachen haben kann. Plausible Erklärungsversuche wären beispielsweise, dass die ausgetauschten Domänen zu lang sind und sich dadurch sterisch behindern (BetPCE) bzw., dass störende Interaktionen zwischen zwei Domänen gleicher Nettoladung die Aktivierbarkeit der chimären Proteine unterbindet (EctPNB, BetPCE). Diese Vermutungen bestätigten sich nicht, da auch die

zusätzliche Verkürzung potentiell inhibierender Domänen (BetPNECA45, BetPCECA30, BetPCECA53, BetPCECA106, EctPNBNA23) nicht zu transportaktiven Proteinen führte. Auch selektive Probleme bei der Proteinsynthese und/oder Membranintegration unter den verwendeten Chimären wären denkbar, erscheinen jedoch unwahrscheinlich, da die einzige Gemeinsamkeit der inaktiven Proteine im Besitz der N-terminalen BetP-Domäne liegt. Um auszuschließen, dass die Inaktivität einiger Chimären auf unzureichenden Proteinmengen beruhen, sollten spezifische Antikörper gegen EctP und BetP hergestellt werden, um Proteinsynthese bzw. Membranintegration der betroffenen Protein-Varianten zu verifizieren. Eine Antikörperherstellung zum Nachweis der Chimären bedingt die Reinigung beider Proteine. Da eine Reinigung von Strep-BetP nach heterologer Expression des *strep-betP*-Fusionsgens in *E. coli* möglich ist (Rübenhagen *et al.*, 2000), wurde diese Strategie auch für EctP angewendet. Hierbei konnte Strep-EctP in hoher Reinheit gewonnen werden (Abbildung 21). Es gelang jedoch trotz zahlreicher Optimierungsversuche nicht, ausreichende Proteinmengen zu erhalten. Auch die Verwendung einer alternativen Reinigungsstrategie, bei der EctP als GST-Fusionsprotein in *E. coli* synthetisiert werden sollte, schlug fehl. Während eine starke Synthese der Glutathion-S-Transferase zu beobachten war, kam es nicht zur Herstellung des GST-EctP-Fusionsproteins (Abbildung 22). Ein Kontrollexperiment, bei dem GST-BetP erfolgreich synthetisiert wurde, belegte, dass das verwendete Expressions-System prinzipiell zur Überproduktion von Membranproteinen geeignet ist (Abbildung 23). Eine eindeutige Erklärung für das Scheitern der heterologen EctP-Synthese gibt es nicht. Eine proteolytische Spaltung des Strep-EctP-Fusionsproteins, welche auch als mögliche Begründung für die Inaktivität von EctP nach Synthese in *E. coli* MKH13 herangezogen wurde, könnte zwar die unzureichende Proteinausbeute im StrepII-tag-System erklären. Sie stellt jedoch keine plausible Erklärung für die gescheiterten Synthesversuche im GST-System dar. In diesem Fall scheint es vielmehr zu einem Abbruch der Translation an der Fusionsstelle zwischen der kodierenden Sequenz für die Glutathion-S-Transferase und *ectP* zu kommen, da die Glutathion-S-Transferase in großen Mengen synthetisiert wurde.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass eine Reinigung des EctP-Proteins, bedingt durch eine unzureichende Synthese in *E. coli* nicht möglich war. Alternative Strategien sind durch die Verwendung anderer Organismen, wie beispielsweise *L. lactis* oder *B. subtilis* gegeben. Eine besonders attraktive Strategie zur Antikörperherstellung bestände zudem in der chemischen Synthese von Peptiden, basierend auf den Aminosäuresequenzen der hydrophoben Schleifen von EctP und BetP. Nur Antikörper gegen diese Proteinbereiche garantieren letztlich die Erkennung einheitlicher Epitope bei allen Chimären bzw. verkürzten

Protein-Varianten und würden dadurch eine Quantifizierung der jeweiligen Proteinsynthese erheblich erleichtern. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass auch der Einsatz chemisch synthetisierter Peptide zur Antikörperherstellung nicht unkritisch ist. Zum einen muss mit einer schwachen Antigenität der kleinen Peptide (maximal 35 Aminosäurereste) gerechnet werden. Zum anderen könnte es selbst bei erfolgreicher Antikörpergewinnung gegen die verwendeten Peptide zu Problemen bei immunologischen *in vivo* Studien kommen, da eine Zugänglichkeit der hydrophilen Schleifen im nativen Protein keineswegs garantiert ist.

Die großen funktionellen Ähnlichkeiten der terminalen EctP- und BetP-Domänen bei gleichzeitig fehlenden Identitäten in ihren Primärstrukturen führt zu einer weiteren wichtigen Frage. Können derartig unterschiedliche Domänen an der Wahrnehmung oder Verarbeitung des gleichen osmotischen Signals, beispielsweise der Erhöhung der internen K^+ -Konzentration, beteiligt sein? Eine eindeutige Beantwortung dieser Frage bedingt eine Rekonstitution von EctP in Proteoliposomen, welche aufgrund der gescheiterten EctP-Reinigungsversuche zu diesem Zeitpunkt nicht möglich ist. Hinweise, dass strukturelle Unterschiede nicht gegen die Wahrnehmung ähnlicher, osmotisch bedingten Reizes sprechen, belegen wiederum die Arbeiten an BetP (Rübenhagen *et al.*, 2001,) und OpuA (Van der Heide *et al.*, 2001) dem osmosensitiver ABC-Transporter für Glycinbetain aus *L. lactis*. Beide Proteine werden im Proteoliposomensystem durch eine Erhöhung der internen Ionenstärke aktiviert, wenngleich das Ausmaß der Aktivierung bei BetP entscheidend vom verwendeten Kation abhängt (die Aktivierung durch K^+ ist wesentlich ausgeprägter als die durch Na^+ ; Schiller, persönliche Mitteilung), während dies bei OpuA nicht der Fall ist. Diese Feststellung und die beeindruckenden, funktionellen Ähnlichkeiten der terminalen Domänen von EctP und BetP hinsichtlich der Aktivitätsregulation, unterstützen die These, dass die terminalen Domänen beider Proteine auf den gleichen osmotischen Reiz reagieren könnten.

4.3 Einfluss amphiphiler Substanzen auf BCCT-Transporter

Die Bandbreite möglicher osmotischer Stimuli ist sehr groß (Wood *et al.*, 1999). Für den überwiegenden Teil osmotisch regulierter Transporter konnten bisher weder die Natur der beteiligten Signale, noch die an deren Wahrnehmung beteiligten Proteinbereiche identifiziert werden. Sämtliche Erkenntnisse bezüglich beteiligter Stimuli gehen auf Studien im Proteoliposomensystem zurück. So zeigten Studien zur osmotischen Regulation von BetP aus *C. glutamicum* und OpuA aus *L. lactis* (Rübenhagen *et al.*, 2001; Van der Heide und

Poolman, 2001), dass beide Transportsysteme durch ähnliche Signale, nämlich die interne K^+ -Konzentration bzw. die interne Ionenstärke, aktiviert werden. Zudem wurden identische Reaktionen der Transportsysteme auf veränderte Phospholipid-Zusammensetzungen beobachtet (Rübenhagen *et al.*, 2000; Van der Heide und Poolman, 2001). Die detaillierten Untersuchungen an OpuA belegen eine direkte Korrelation zwischen der Verschiebung des Schwellenwerts zur Aktivierung des Proteins und Änderungen in der Oberflächenladung der umgebenden Phospholipidmembran, welche durch Verwendung unterschiedlich geladener Phospholipid-Kopfgruppen bzw. unterschiedlich geladener Lokalanästhetika variiert wurde. Sowohl das Ersetzen negativ geladener Phospholipide durch ungeladene als auch die Anwesenheit des Lokalanästhetikums Tetracain, welches unter den gewählten Versuchsbedingungen eine positive Nettoladung trägt, setzte den Schwellenwert der OpuA-Aktivierung signifikant herab. Die Verwendung des negativ geladenen Lokalanästhetikums Capronsäure rief den gegenteiligen Effekt hervor, während ungeladenes Dekan keinen signifikanten Einfluss auf den Schwellenwert der OpuA-Aktivierung hatte. Durch die Kombination dieser Zusammenhänge und der Kenntnis des aktivierenden Signals, die Zunahme der internen Ionenstärke, stellten Van der Heide und Poolman (2001) ein Modell zur OpuA-Aktivierung auf und postulierten darüber hinaus dessen generelle Gültigkeit für alle osmotisch regulierten Transportsysteme. Dieses Modell besagt, dass der Transduktion eines internen osmotischen Signals zu einem Protein, essentielle, elektrostatische Wechselwirkungen zwischen einem Transporter und der umgebenden Membran zugrunde liegen. Der beschriebene Zusammenhang zwischen Phospholipid-Zusammensetzung und dem Aktivierungsverhalten des Proteins wurde auch für BetP beobachtet (Rübenhagen *et al.*, 2000). In der vorliegenden Studie zur Wirkung geladener Lokalanästhetika konnte jedoch keine Korrelation zwischen der Aktivitätsregulation von EctP, LcoP oder BetP und veränderten Oberflächenladungen (Abbildung 19, 20) entdeckt werden. Das positiv geladene Tetracain inhibierte bereits in geringen Konzentrationen ($< 0,5$ mM) osmotisch voraktivierte EctP- und LcoP-Proteine, während BetP signifikant aktiviert wurde. Unter identischen osmotischen Bedingungen und Verwendung von bis zu 1,25 mM der negativ geladenen Capronsäure bzw. des ungeladenen Dekans konnten hingegen keine signifikanten Änderungen im Aktivierungsverhalten der Proteine beobachtet werden. Weiterführende Experimente an EctP und BetP, in denen die osmotischen Bedingungen variiert und die verschiedenen Lokalanästhetika im Bereich ihrer zuvor identifizierten, höchsten Wirksamkeiten (1 mM) eingesetzt wurden zeigten, dass die Reaktion der Proteine auf Lokalanästhetika unabhängig von einer osmotischen Voraktivierung ist (Abbildung 20). Während eine

Aktivierung von EctP aufgrund der hemmenden Wirkung von Tetracain nicht möglich war, aktivierte Tetracain BetP auch in Abwesenheit von hyperosmotischem Stress. Capronsäure und Dekan zeigten hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivierbarkeit der Proteine. Diese Ergebnisse veranlassen zu folgenden Aussagen: 1. Das Model zur OpuA-Aktivierung besitzt keinesfalls generelle Gültigkeit, zumindest nicht für Proteine der BCCT-Familie. Veränderungen der Oberflächenladungen scheinen nicht die Ursache für die beobachtete Aktivierung von BetP, bzw. Inhibierung von LcoP und EctP zu sein, da keine gegenläufigen Reaktionen der Proteine auf positive bzw. negative Ladungen zu beobachten waren. 2. Die Tatsache, dass die Proteine ausschließlich auf Tetracain reagierten, dessen räumliche Struktur wesentlich ausgeprägter ist als die von Capronsäure oder Dekan, spricht eher für eine physikalisch bedingte Aktivierung bzw. Inhibierung der Proteine aufgrund veränderter Membranspannung bzw. Membranfluidität. 3. BetP nimmt, neben einer osmotisch bedingten Erhöhung der K^+ -Konzentration weitere stressbedingte Signale wahr, da es durch Tetracain auch ohne hyperosmotischen Stress aktiviert wird. Diese Beobachtung stimmt zudem sehr gut mit der im Abschnitt 4.1 diskutierten Kälteaktivierung von BetP überein.

Die Experimente zum Einfluss von Tetracain auf verkürzte EctP- und BetP-Varianten lieferten weitere interessante Aspekte der Osmoregulation (Abbildung 18). Tetracain inhibierte sowohl EctP als auch die Mutante EctPC Δ 106, bei der die C-terminale Domäne vollständig entfernt wurde, gleichermaßen. Die C-terminale Domäne kann demzufolge nicht an der Wahrnehmung des Moleküls beteiligt sein. Da EctP bei Verlust der N-terminalen Domäne auf die Anwesenheit von Tetracain mit einer schwachen Aktivierung reagierte, muss die Wahrnehmung des Moleküls über den zentralen Bereich des Proteins zwischen dem ersten und zwölften Transmembransegment erfolgen. Diese Tatsache kann ausschließlich durch die Existenz eines weiteren sensorischen Proteinbereichs erklärt werden. Für BetP können derartige Rückschlüsse nicht getroffen werden. Hier kann nur die N-terminale Domäne als Tetracain-Wirkort ausgeschlossen werden, da die N-terminal verkürzte Mutante BetPN Δ 60 (Peter *et al.*, 1998a) wie das Wildtyp-Protein mit gesteigerter Transportaktivität auf die Anwesenheit von Tetracain reagiert. Über die Beteiligung der C-terminalen BetP-Domäne an der Wahrnehmung des Lokalanästhetikums kann nur spekuliert werden, da das verkürzte BetP-Protein (BetPC Δ 45) bereits in Abwesenheit von Tetracain permanent aktiv ist.

4.4 Untersuchungen zur Struktur der C-terminalen EctP-Domäne

Erste Hinweise auf die molekularen Mechanismen der Reizwahrnehmung durch osmotisch regulierte BCCT-Proteine gehen auf Strukturuntersuchungen an der isolierten C-terminalen Domäne von BetP zurück (Burger 2002). CD-spektroskopische Messungen zeigten, dass diese in wässriger Umgebung unstrukturiert vorliegt, während Wechselwirkungen mit hydrophoben Oberflächen eine α -helikale Struktur induzieren. Da diese Strukturänderung derzeit als Teil des regulatorischen Mechanismus zur Aktivierung von BetP diskutiert wird, wurde auch die funktionell konservierte C-terminale Domäne von EctP bezüglich derartiger Strukturänderungen untersucht. Die Grundlage für strukturelle Untersuchungen wurde durch die erfolgreiche Synthese der C-terminalen Domäne von EctP in *E. coli* und die Etablierung eines geeigneten Reinigungssystems geschaffen (Abbildung 24, 25). Überraschenderweise stimmte das theoretische Molekulargewicht der C-terminalen Domäne (12,3 kDa) nicht mit dem apparenten Molekulargewicht des gereinigten Proteins (28 kDa) überein. Immunologische Studien und die Analyse durch Edmann-Abbau erbrachten jedoch den Beweis, dass es sich tatsächlich um die C-terminale Extension von EctP handelte. Das ungewöhnliche Laufverhalten der gereinigten C-terminalen EctP-Domäne bei SDS-Page-Analysen deutet auf eine Dimerisierung hin. Zu diesem Zeitpunkt ist jedoch weder ersichtlich, ob es sich dabei um eine funktionelle Eigenschaft der Domäne handelt, noch ist eine Aussage über die Natur der zugrundeliegenden Wechselwirkungen möglich.

Die CD-spektroskopischen Untersuchungen an der isolierten C-terminalen EctP-Domäne ergaben keine Hinweise auf die Ausbildung bzw. das Auflösen einer charakteristischen Sekundärstruktur, wie sie für BetP beobachtet wurde. Weder durch hydrophobe Wechselwirkungen noch durch Erhöhung der Ionenstärke änderte sich das CD-Spektrum, welches mit einem starken Minimum bei 200 nm auf eine „random-coiled“-Struktur der Domäne hindeutet (Abbildung 26). Diese Ergebnisse schließen jedoch eine generelle Strukturänderung der C-terminalen EctP-Domäne als Reaktion auf einen osmotischen Reiz nicht grundsätzlich aus. Es muss vielmehr bedacht werden, dass unter der Definition „random-coiled“-Struktur eine große Zahl unterschiedlicher Faltungsmöglichkeiten eines Proteins zusammengefasst wurden, um sie von hochgeordneten, regelmäßigen Strukturen wie der α -Helix oder der β -Faltblattstruktur abzugrenzen. Strukturelle Änderung, innerhalb einer „random-coiled“-Struktur können jedoch durch CD-spektroskopische Messungen aufgrund zu geringer Signalveränderungen nicht detektiert werden.

Ungeachtet der strukturellen Unterschiede sprechen die ausgeprägten Ähnlichkeiten im

Aktivierungsverhalten von EctP und BetP für einen funktionell konservierten Regulationsmechanismus. In beiden Fällen sind die terminalen Domänen für eine gleichartige Osmoregulation der Proteine verantwortlich. Aufgrund der unterschiedlichen Primärstrukturen der Domänen scheint es jedoch unwahrscheinlich, dass sie einen osmotischen Reiz in identischer Form wahrnehmen können, z.B. K^+ -Ionen in gleicher Art und Weise binden. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen daher eher für generellere Konformationsänderungen der terminalen Domänen als Folge, beispielweise veränderter interner Ionenstärke, welche dann auf bisher nicht verstandene Weise zur katalytischen Domäne der Transporter weitergeleitet werden.

Da, (a) eine veränderte Membranumgebung, herbeigeführt durch die Verwendung von Tetracain, die Aktivitäten von EctP und BetP gegenläufig moduliert, (b) die Wahrnehmung dieser Moleküle über die zentralen Proteinbereiche zu erfolgen scheint und (c) BetP „Kalium-unabhängig“ durch Tetracain bzw. Kältestress aktiviert werden kann, muss neben der Reizwahrnehmung und Signaltransduktion durch die terminalen Domänen ein zweiter, unabhängiger Signal-Transduktionsweg angenommen werden.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die Mechanismen der Osmoregulation weitaus komplizierter und vielfältiger sind, als es die Studien an einzelnen osmotisch regulierten Protein, wie BetP oder OpuA (Peter *et al.*, 1996, 1998a; Rübenhagen *et al.*, 2000, 2001; Van der Heide und Poolman, 2000, 2001) bisher vermuten ließen. Zu den vorrangigen Zielen weiterführender Arbeiten wird es gehören, eine geeignete Reinigungsstrategie für EctP zu etablieren. Untersuchungen am isolierten Protein im Proteoliposomensystem sollten zweifelsfrei die Frage klären, ob EctP intrinsische, osmosensorische Eigenschaften besitzt, oder ob weitere Zellkomponenten zur Wahrnehmung osmotischer Reize benötigt werden. Auch die Frage nach der Natur des aktivierenden Signals könnte durch die Verwendung dieses System beantwortet werden. Ein weiteres wichtiges Ziel besteht im Erhalt spezifischer Antikörper gegen EctP und BetP. Immunologische Studien zur Proteinsynthese und Membranintegration inaktiver EctP- bzw. BetP-Varianten könnten klären, ob es sich tatsächlich um nicht aktivierbare Transporter handelt, oder ob dem Phänomen der Inaktivität Probleme bei der Proteinsynthese zugrunde liegen. Des weiteren könnten Untersuchungen zur Kälteaktivierung verkürzter BetP-Mutanten zur Klärung der Frage nach der Natur des postulierten, zweiten Signal-Transduktionsweges herangezogen werden.

5 Zusammenfassung

Das Gram-positive Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum* ist mit vier osmotisch regulierten Transportsystemen für die Aufnahme der kompatiblen Solute Glycinbetain, Ectoin und Prolin ausgestattet. Drei von ihnen, BetP, EctP und das in dieser Studie identifizierte Transportprotein LcoP gehören zur Familie der Betain/Cholin/Carnitin-Transporter (BCCT). Osmotisch regulierte Mitglieder dieser Familie von Na⁺-Symportern zeichnen sich durch den Besitz von cytoplasmatisch lokalisierten N- und C-terminalen Domänen aus, welche im Fall von BetP maßgeblich an der Wahrnehmung und/oder Verarbeitung eines osmotischen Signals beteiligt sind. Basierend auf den detaillierten Untersuchungen zur osmotischen Regulation von BetP beschäftigte sich diese Arbeit mit der Frage, ob die terminalen Domänen von EctP in gleicher Weise an der Osmoregulation beteiligt sind, also gegebenenfalls ein konservierter Regulationsmechanismus zugrunde liegt. Des Weiteren wurde durch die Verwendung unterschiedlich geladener Lokalanästhetika der Einfluss der Membrenumgebung auf osmotisch regulierte BCCT-Transporter untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit ist erstmals die Herstellung eines transportdefizienten *C. glutamicum*-Stammes (DHPF) für kompatible Solute gelungen. Im Verlauf der Stamm-Konstruktion konnte ein Gen, welches ein bisher unbekanntes, osmotisch reguliertes Aufnahmesystem für kompatible Solute kodiert (LcoP), identifiziert und deletiert werden. Durch Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz wurde LcoP der BCCT-Familie zugeordnet. Die biochemische Charakterisierung des Proteins bestätigte, dass es sich um einen weiteren Na⁺-abhängigen, sekundären Transporter handelt, der die Aufnahme von Glycinbetain und Ectoin unter hyperosmotischen Bedingungen katalysiert.

Die Aktivitätsregulation von EctP wurde durch schrittweise Verkürzungen der N- und C-terminalen Domänen untersucht. Durch die Herstellung einer C-terminal verkürzten BetP-Mutante und den Vergleich der EctP-Ergebnisse mit bekannten BetP-Daten wurden Hinweise auf einen funktionell konservierten Regulationsmechanismus erhalten. Die N-terminalen Domänen sind demnach entscheidend an der Aktivierung der Proteine beteiligt, während die C-terminalen Domänen einen osmotischen Reiz wahrnehmen und die Inhibition der Transportaktivität bei Abwesenheit hyperosmotischer Bedingungen gewährleisten.

Die Konstruktion und funktionelle Analyse eines vollständigen Satzes von EctP/BetP-Chimären, bei denen die regulatorischen, terminalen Domänen wechselseitig ausgetauscht wurden, ergab weitere Hinweise auf eine starke, aktivierende Funktion der

N-terminalen EctP-Domäne, zeigten jedoch auch, dass eine funktionelle Ersetzbarkeit der C-terminalen Domänen nicht gegeben ist.

Durch die Verwendung unterschiedlich geladener Lokalanästhetika wurde der Einfluss der Membranumgebung auf die Aktivitätsregulation von LcoP, EctP und BetP untersucht. Im Rahmen dieser Studien konnte die Allgemeingültigkeit eines kürzlich aufgestellten Modells zur Aktivierung osmotisch regulierter Transportsysteme widerlegt werden. Zudem sprechen die Untersuchungen zur Wirkungsweise von Tetracain für das Bestehen eines zweiten proteinintrinsischen Signal-Transduktionsweges, dessen Existenz durch Untersuchungen zur Kälteaktivierung von BetP untermauert werden konnte.

Die Versuche zur Reinigung des EctP-Proteins nach Synthese in *E. coli* blieben trotz Verwendung unterschiedlicher Expressionssysteme ohne Erfolg. Kontrollexperimente zeigten jedoch, dass die verwendeten Systeme prinzipiell zur Produktion von integralen Membranproteinen geeignet sind. Es muss daher von Protein-spezifischen Problemen, z.B. einer toxischen Wirkung von EctP auf *E. coli* ausgegangen werden.

Durch die erfolgreiche Synthese der C-terminalen EctP-Domäne in *E. coli* BL21 und deren anschließender Reinigung, wurden die Grundlagen für zukünftige Strukturuntersuchungen geschaffen. CD-spektroskopische Analysen, bei denen die Fähigkeit der C-terminalen EctP-Domäne zur Ausbildung hochgeordneter Strukturen in Anwesenheit von hydrophoben Oberflächen, KCl und NaCl untersucht wurde, ergaben keine zwingenden Hinweise auf funktionsrelevante Strukturveränderungen innerhalb der Domäne.

6 Anhang 1: Nukleotid- und abgeleitete AS-Sequenz von LcoP

		RBS	Start
		↓	↓
Nukleotide	1	CCACCTCATTGTGGTGCACAA TGGAGAGGA CACACAT	G TCCACCAACTCTGGCAATAAC
Aminosäuren			M S T N S G N N
	61	TTGCCTGAATCCCAAGAGTCA CCCGAGGA ACCTCATTATCCTCACGACACCCACCCAGGC	
		L P E S Q E S P E E P H Y P H D T H P G	
	121	CTAGTTCCTGGCATTTCGGT CGATGCTCAACGCAACAAGTTCGGACTCGACAAAACCGTT	
		L V P G I S V D A Q R N K F G L D K T V	
	181	TTCGGCGTCA CCGCAGC ATTAATTCTGGCGTTCATCGCCTGGGGCATTTCAGCCCTGAT	
		F G V T A A L I L A F I A W G I S S P D	
	241	TCGGTTTCTT CAGTATCGTCCACGATGTT CAGTTGGGCTATGACGAATACTGGTTGGCTC	
		S V S S V S S T M F S W A M T N T G W L	
	301	CTCAACTTTGT CATGCTGATCGGC ATTGGCACCATGCTCTACATCGCTTTTTTCGCGCTAC	
		L N F V M L I G I G T M L Y I A F S R Y	
	361	GGCCGCATCAAGCTGGGCACGGACGAAGACGAACCAGAATTCTCTCGCTTTTCTGGATT	
		G R I K L G T D E D E P E F S R F S W I	
	421	GCGATGATGTTCCGGCGCCGGC ATCGGTGT CGGTATCTTCTTCCGGTCTCCGAACCG	
		A M M F G A G I G V G I F F G P S E P	
	481	CTGTGGCATTATCTCAGTCCCCCACCTCACACCGTGAAGGATCTACACCTGAGTCCTTG	
		L W H Y L S P P P H T V E G S T P E S L	
	541	CACCAAGCACTTGC GCAGTCCCACTTCCACT GGGGCTTATCCGGCTGGGGCTGTATGCC	
		H Q A L A Q S H F H W G L S A W G L Y A	
	601	TTGGTCCGGCGCGCGT TGGCGTACTCCAGTT ACCGACGCGCGCGTAACTTGATCAGC	
		L V G G A L A Y S S Y R R G R V T L I S	
	661	TCCACCTTCCGGTCACTTTTCCGGT GAGAAAACCGAAGG TATCGCGGGTCCGCTCATCGAC	
		S T F R S L F G E K T E G I A G R L I D	
	721	ATGATGGCGATCATCGCCACGCTGTTTGGAAACGGCTGCAACCTTGGCCCTTTCAGCAATT	
		M M A I I A T L F G T A A T L G L S A I	
	781	CAGGTTGGT CAGGGCGTGCAGATTATTTCT GGCGCTTCGGAAATCACCAACAACATCTTG	
		Q V G Q G V Q I I S G A S E E N N I L	
	841	ATCGCCATCATCGCGATCTTGACCATTGGCTT CATCATCTCCTCAGTATCTGGCGTGTCC	
		I A I I A I L T I G F I I S S V S G V S	
	901	AAGGCATTCGTTATCTTTCCAACCTCAATATTTTCTTGACGCTTGGCATTGGCTCTGTTT	
		K G I R Y L S N L N I S L T L G L V L F	
	961	GTGTT CATCACCGGCCACCTTGTTCCCTGCTCAACT TGATCCCATCGAGTGTGTTGGAA	
		V F I T G P T L F L L N L I P S V L E	
	1021	TATGGCAGTGAGTCTTGTC AATGGCTGGCAAGTCTTT TGCTGGGGTGAGGAAACCAATT	
		Y G S E F L S M A G K S L S W G E E T I	
	1081	GAATCCAAGCTGGTTGGACGGCTTCTACTGGGCATGGTGGATCGCATGGATCCCAATTC	
		E F Q A G W T A F Y W A W W I A W T P F	
	1141	GTGGGTATGTT CATCGCGTATTTCTCGCGGCCGACCT TGCGTGAATTCGCGCTCATC	
		V G M F I A R I S R G R T L R E F L I	
	1201	ACCATGGCTATCCCTCCTT CATTTTGATCCTGGCGTTC ACCATTTTCGGTGGAACTGCC	
		T M A I P S F I L I L A F T I F G G T A	
	1261	ATCACGATGAACCGCGAGAACGTAGATGGTTTTGACGGCAGTTCATCCAAGGAACAGGTG	
		I T M N R E N V D G F D G S S S K E Q V	
	1321	CTGTTTGATATGTT CAGCAACCTTCCGCTGTACTCGAT CACACCGTTCATTTTGATCTTT	
		L F D M F S N L P L Y S I T P F I L I F	
	1381	GTGCTGGCAGTATCTTTGTT ACCTCTGCCGATTCCGCCTCCG TGGTATGGGAACGATG	
		V L A V F F V T S A D S A S V V M G T M	
	1441	AGTCCCAAGGTAACCTGCACCAAAACAAATTAATCGTGGTGTCTGGGGACTGTGCATG	
		S S Q G N P A P N K L I V V F W G L C M	
	1501	ATGGC CATCGCGTGGT CATGCTGCTTACTGGTGGCGAATCCCGCTGACTGGTCTGCAG	
		M G I A V V M L L T G G E S A L T G L Q	
	1561	AACCTCACCATTTGATCGCCATTCCGTTTGGCGTGGTGTGATCGTATGGCTATTGCC	
		N L T I L I A I P F A L V L I V M A I A	
	1621	TTTATTAAGGACTTATCCACAGACCCAGCCGCTATTCGACAACCGTATGCAAAAGGCAGCC	
		F I K D L S T D P A A A I R Q R Y A K A A	
	1681	ATCTTAACGCGGTGTT CGTGGCTTGAAGAACACGGCGAC CACTTCGAGCTCTCCATC	
		I S N A V V R G L E E H G D D F E L S I	
	1741	GAACCTGCAGAGGAAGT CGTGGAGCGGGT GCTACCTTCGATTCCACCGCTGATCACATC	
		E P A E E G R G A G A T F D S T A D H I	
	1801	ACCGACTGGTATCAGCGCACCGACGAAGAAGGCAATGATGTTGATTGACTTACCACC	
		T D W Y Q R T D E E G N D V D Y D F T T	
	1861	GGCAAATGGGCGATGGTTGGACACCGGAATCGACCGAAGAAGGCAAGTGGACGCGAAA	
		G K W A D G W T P E S T E E G E V D A K	
	1921	AAGGATTA	
		K D -	

7 Literatur

- Abe, S., Takayama, K. und Kinoshita S. 1967.** Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**, 279-301.
- Agre, P., Preston, G. M., Smith, B. L., Jung, J. S., Raina, S., Moon, C., Guggino, W. B. und Nielsen, S. 1993.** Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *Am. J. Physiol.* **265**, 463-476.
- 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., Besnard, M., Ajouz, B., Coulombe, A. und Ghazi, A. 1996.** Multiple mechanosensitive ion channels from *Escherichia coli*, activated at different thresholds of applied pressure. *J. Membr. Biol.* **151**, 175-187.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J. 1987.** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Blunden, G., EL Baroundi, M. M., Godon, S. M., McLean, W. F. H. und Rogers, D. J. 1981.** Extraction purification and characterisation of Dragendorff-positive compounds from British marina algae. *Botanica Marina* **23**, 451-456.
- Boscari, A., Mandon, K., Dupont, L., Poggi, M.-C. und Le Rudulier, D. 2002.** BetS is a major Glycine betain/Proline betaine Transporter required for early osmotic adjustment in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **184**, 2654-2663.
- Bovell, C. R., Packer, L. und Hergerson, R. 1963.** Permeability of *Escherichia coli* to organic compounds and inorganic salts measured by light scattering. *Biochem. Biophys. Acta* **75**, 257-266.
- 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.
- Britton, K. L., Stillman, T. J., Yip, K. S., Forterre, P., Engel, P. C. und Rice, D. W. 1998.** Insights into the molecular basis of salt tolerance from the study of glutamate dehydrogenase from *Halobacterium salinarum*. *J. Biol. Chem.* **273**, 9023-9030.
- Brown, A. D., Kylie, F., Mackenzie, F. und Singh, K. K. 1986.** Selected aspects of microibal osmoregulation. *FEMS Microbiology Reviews* **39**, 31-36.

- Burger, U. 2001.** Struktur und Funktionsanalysen am osmotisch regulierten Transporter BetP aus *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Universität zu Köln.
- Calmita, G., Bishani, W. R., Preston, G. M., Guggine, W. B. und Agre, P. 1995.** Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**, 29063-29066.
- Chen, Y.-H., Yang, J. T. und Martinez, H. M. 1972.** Determination of the secondary structure of proteins by circular dichroism and rotatory dispersion. *Biochem.* **11**, 4120-4131.
- 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.
- Csonka, L. N. und Hanson, A. D. 1991.** Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 569-606.
- Culham, D. E., Tripet, B., Racher, K., Voegelé, R. T., Hodges, R. S. und Wood, J. M. 2000.** The role of the carboxy terminal alpha-helical coiled-coil domain in osmosensing by transporter ProP of *Escherichia coli*. *J. Mol. Recognit.* **13**, 309-322.
- Delamarche, C. D., Thomas, J. P., Rolland, A., Froger, J., Gouranton, M., Svelto, P. und Calamati, C. 1999.** Visualisation of AqpZ-mediated water permeability in *Escherichia coli* by cryoelectron microscopy. *J. Bacteriol.* **181**, 4193-4197.
- 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.
- Elcock, A. H. und McCammon, J. A. 1998.** Electrostatic contributions to the stability of halophilic proteins. *J. Mol. Biol.* **280**, 731-748.
- Eikmanns, B. J., Thum-Schmitz, N., Eggeling, L., Lüdtge, K. U. und Sahm, H. 1994.** Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *gltA* gene encoding citrate synthase. *Microbiology* **140**, 1817-1828.
- Eikmanns, B. J., Kleinertz, E., Liebl, W. und Sahm, H. 1991.** A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for gene cloning, controlled gene expression and promoter probing. *Gene* **102**, 93-98.

- Eikmanns, B. J. 1992.** Identification, sequence analysis, and expression of a *Corynebacterium glutamicum* gene cluster encoding the three glycolytic enzymes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 3-phosphoglycerate kinase and triosephosphate isomerase. *J. Bacteriol.* **174**, 6076-6086.
- Farwick, M., Siewe, R. M. und Krämer, R. 1995.** Glycine betaine uptake after hyperosmotic shift in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **177**, 4690-4695.
- Galinski, E. A., und Trüper, H. G. 1994.** Microbial behaviour in salt stressed ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**, 95-108.
- Galinski, E. A. 1995.** Osmoadaptation in *Bacteria*. *Adv. Microb. Physiol.* **37**, 273-328.
- Gans, P. L., Lyu, P. C., Manning, M. C. Woody, R. W. und Kallenbach, N. R. 1991.** The helic-coil transition in heterogeneous peptides with specific side-chain interactions: Theory and comparison with CD spectral data. *Biopolymers* **31**, 1605-1614.
- Glaasker, E., Konings, W. N. und Poolman, B. 1996.** Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **178**, 575-82.
- Gerhardt, P. N. M., Smith, L. T. und Smith G. M. 2000.** Osmotic and chill activation of glycine betaine porter II in *Listeria monocytogenes* membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **182**, 2544-2550.
- Grammann, K., Volke, A. und Kunte, H. J. 2002.** New type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the bacteria domain: TRAP transporter TeaABC mediates uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581(T). *J. Bacteriol.* **184**, 3078-3085.
- 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.
- Hanahan, D. 1985.** Techniques for transformation of *Escherichia coli*. Seite 109-136. In Glover, D. M. (ed.), DNA cloning, **1**, IRL Press, Oxford.
- Hecker, M., Schumann, W. und Volker, U. 1996.** Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **19**, 417-428.
- Henderson, P. J. F. und Maiden, M. C. 1989.** Homologies between sugar transporters from eucaryotes and procaryotes. *Annu. Rev. Physiol.* **51**, 459-471.

- Hohmann, I., Bill, R. M., Kayingo, I. und Prior B. A. 2000.** Microbial MIP channels. *Trends Microbiol.* **8**, 33-38.
- Inoue, H., Nojime, H. und Okayama, H. 1990.** High efficiency transformation of *E. coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Kappes, R. M., Kempf, B. und Bremer, E. 1996.** Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization 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 gamma-butyrobetaine via the ABC transport system OpuC. *Microbiology* **144**, 83-90.
- Kappes, R. M., Kempf, B., Kneip, S., Boch, J., Gade, J., Meier-Wagner, J. und Bremer, E. 1999.** Two evolutionarily closely related ABC transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **32**, 203-216.
- Kemble, A. R. und MacPherson, H. T. 1954.** Liberation of amino acids in perennial rye grass during wilting. *Biochem.* **58**, 46-59.
- 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.
- Killham, K. und Firestone, M. K. 1984.** Salt stress control of intracellular solutes in *Streptomyces* indigenous to saline soils. *Appl. Environ. Microbiology* **47**, 301-306.
- Koch, A. 1982.** On the growth and form of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 2527-2540.
- 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.
- Lamark, T., Kaasen, I., Eshoo, M. W., Falkenberg, P., McDougall, J. und Strom, A. R. 1991.** DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**, 1049-1064.

- 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.
- Levina, N., Totemeyer, S., Stokes, N. R., Louis, P., Jones, M. A. und Booth, I. R. 1999.** Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. *Embo J.* **18**, 1730-1737.
- Liebl, W., Bayerl, A., Schein, B., Stillner, U. und Schleifer, K. H. 1989.** High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **65**, 299-330.
- May, G., Faatz, E., Villarejo, M. und Bremer, E. 1986.** Binding protein dependent transport of glycine betaine and its osmotic regulation in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen.* **205**, 225-233.
- 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.
- Miller, J. H. 1992.** A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y.
- Miller, K. J., und Wood, J. M. 1996.** Osmoadaptation by Rhizosphere Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 101-36.
- Millner, J. L., Grothe, S. und Wood, J. M. 1988.** Proline porter II is activated by a hyperosmotic shift in both whole cells and membrane vesicles of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* **263**, 14900-14905.
- Moe, P. C., Blount, P. und Kung, C. 1998.** Functional and structural conservation in the mechanosensitive channel MscL implicates elements crucial for mechanosensation. *Mol. Microbiol.* **28**, 583-592.
- Moller, S., Croning, M. D. und Apweiler, R. 2002.** Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* **18**, 218.
- Morbach, S. und Krämer, R. 2002.** Body shaping und water stress: osmosensing and osmoregulation of solute transport in bacteria. *ChemBioChem.* **3**, 384-397.

- Morris, C. E. 1990.** Mechanosensitive ion channels. *J. Membrane Biol.* **113**, 93-107.
- 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., Faldoma, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. 1986.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **51**, 263-273.
- Nottebrock, D. 2000.** Mechanosensitive Kanäle in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Universität zu Köln
- Özcan, S., Dover, J. und Johnston, M. 1998.** Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO. J.* **17**, 2566-2573.
- 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 characterization of the Proline/Ectoine uptake system, ProP and the Ectoine/Proline/Glycine betaine carrier EctP. *J. Bacteriol.* **180**, 6005-6012.
- Poolman, B. und Glaasker, E. 1998.** Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol.* **29**, 397-407.
- Potts, M. 1994.** Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev.* **58**, 755-805.
- 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., White, G. und Hallett, F. R. 1999.** Purification and reconstitution of an osmosensor: transporter ProP of *Escherichia coli* senses and responds to osmotic shifts. *Biochemistry* **38**, 1676-1684.

- Redenbach, M., Kieser, H. M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H. und Hopwood, D. A. 1996.** A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* **21**, 77-96.
- Rosenstein, R., Futter-Bryniok, D. und Gotz, F. 1999.** The choline-converting pathway in *Staphylococcus xyloso* C2A: genetic and physiological characterization. *J. Bacteriol.* **181**, 2273-2278.
- Rönsch, H. 2000.** Untersuchungen zum Einfluss der Osmoregulation auf die Aminosäureproduktion mit *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Universität zu Köln
- Rübenhagen, R., Rönsch, 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., Morbach, S. und Krämer, R. 2001.** The osmoreactive betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* is a sensor for cytoplasmic K⁺. *EMBO J.* **20**, 5412-5420.
- Ruffert, S., Berrier, C., Krämer, R. und Ghazi, A. 1999.** Identification of mechanosensitive ion channels in the cytoplasmic membrane of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **181**, 1673-1676.
- Sackin, H. 1995.** Mechanosensitive channels. *Annu. Re. Physiol.* **57**, 333-353.
- Saier, M. H. Jr., Eng, B. H., Fard, S., Garg, J., Haggerty, D. A., Hutchinson, W. J., Jack, D. L., Lai, E. C., Liu, H. J., Nusinew, D. P., Omar, A. M., Pao, S. S., Paulsen, I. T., Quan, J. A., Sliwinski, M., Tseng, T. T., Wachi, S. und Young, G. B. 1999.** Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *Biochim. Biophys. Acta* **1422**, 1-56.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higushi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. 1988.** Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase. *Science* **23**, 487-491.
- 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.
- Schäfer, A., Kalinowski, J., Simon, R., Seep-Feldhaus, A. H. und Pühler, A. 1990.** High-frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria. *J. Bacteriol.* **172**, 1663-1666.

- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. und Pühler, A. 1994.** Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**, 69-73.
- 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.
- Silver, S. 1996.** Transport of inorganic cations In: Neidhardt *et al.* (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2nd edn. Washington, DC. American Society for Microbiology, 1091-102.
- Sleator, R. D., Gahan, C. G., Abee, T. und Hill, C. 1999.** Identification and disruption of BetL, a secondary glycine betaine transport system linked to the salt tolerance of *Listeria monocytogenes* LO28. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 8974-8982.
- Smith, D. B. und Johnson, K. S. 1988.** Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40.
- Simon, R., Prierer, U. und Pühler, A. 1983.** A broad host range mobilisation system for in vitro genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio/Technology* **1**, 784-791.
- Skerra, A. 1994.** Use of tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**, 131-135.
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A. 1986.** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.
- Stumpe, S., Schlösser, A., Schleyer, M. und Bakker, E. P. 1996.** K⁺ circulation across the prokaryotic cell membrane: K⁺ uptake systems. In: Konings, W. N., Kaback, H. R. and Lolkema, J. S. (eds.). *Handbook of Biological Physics*, Vol. 2, Amsterdam: Elsevier, 474-99.
- Sukarev, S., Betanzos, M., Chiang, C. S. und Guy, H. R. 2001.** The gating mechanism of the large mechanosensitive channel MscL. *Nature* **409**, 720-724.
- 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.

- Tamas, M. J., Luyten, K., Sutherland, F. C. W., Hernandez, A., Albertyn, J., Valadi, H., Li, H., Prior, B. A., Kilian, S. G., Ramos, J., Gustafsson, L., Thevelein, J. M. und Hohmann, S. 1999.** Fps1 controls the accumulation and release of compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Mol. Microbiol.* **31**, 1087-1104.
- 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.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7102-7106.
- Van der Heide, T., Stuart, M. C. und Poolman, B. 2001.** On the osmotic signal and osmosensing mechanism of an ABC transport system for glycine betaine. *EMBO J.* 2001 **20**, 7022-7032.
- Van der Rest, M. E., Lange, C. und Molenaar, D. 1999.** A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 541-545.
- Ventosa, A., Nieto, J. J. und Oren A. 1998.** Biology of aerobic moderately halophilic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 504-544.
- Vieira, J. und Messing, J. 1982.** The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**, 259-268.
- Whatmore, A. M., Chudek, J. A. und Reed, R. H. 1990.** The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 2527-2535.
- Wood, J.M. 1988.** Proline porters effect the utilization of proline as nutrient or osmoprotectant for bacteria. *J. Memb. Biol.* **106**, 183-202.
- Wood, J.M. 1999.** Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 230-262.
- Wood, J. M., Bremer, E., Csonka, L. N., Krämer, R., Poolman, B., Van der Heide, T. und Smith, L. T. 2001.** Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **130**, 437-460.
- 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.

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

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. *Nucleic Acids Res.* **18**, 105-109.

Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich bei all denen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen und mich, in welcher Form auch immer, unterstützt haben.

Ich danke

Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für die Überlassung des interessanten Themas, seine stete Diskussionsbereitschaft und fortwährende Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit.

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

Susanne (Frau Dr. Morbach) für Ihre Geduld bei der Betreuung dieser Arbeit, das stets kollegiale, freundliche Arbeitsklima und viele hilfreiche Ratschläge.

meinen aktuellen KollegInnen aus der zweiten Welt, Dirk, Andreas, Oliver, Nina, Eva, Ute, Martin, Johannes, sowie den bereits „von uns gegangenen“ für ihre stete Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Atmosphäre, ob im Labor oder beim Kaffeetrinken auf der Dachterrasse.

all meinen ehemaligen und jetzigen LaborkollegInnen aus den anderen Welten für die alltäglichen wissenschaftlichen Hilfestellungen und zwischenmenschlichen Kontakte, die zu einer prima Stimmung in der Arbeitsgruppe beigetragen haben.

Anja von den Schomburg's für die Unterstützung bei den CD-Messungen.

der „Studienstiftung des deutschen Volkes“ für ihr Vertrauen in das Projekt und ihre finanzielle Unterstützung.

Gunhild Stöhr für „tapferes“ Korrekturlesen der Arbeit.

all meinen Freunden, die immer für mich da waren und mich wieder aufgebaut haben wenn ich mal ganz unten war.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern und meinem Bruder Jürgen, die es sicher nicht immer leicht mit mir hatten und trotzdem immer zu mir gehalten haben.

Erklärung

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

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

Keine Teilpublikationen

Datum:

Unterschrift:

Ralf Steger
Melissenweg 54
51061 Köln

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Geburtsdatum: 11. August 1969
Geburtsort: Lingen/Ems
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

1976-1980: Grundschule, Lingen
1980-1982: Orientierungsstufe am Wall, Lingen
1982-1990: Gymnasium Georgianum, Lingen
Abschluss: Abitur

Zivildienst

September 1990 - Dezember 1991: Sozialdienst katholischer Männer, Lingen

Berufstätigkeit

April 1992 - September 1993: Fußboden- und Estrichleger
Fa. Nebelsiek, Nordlohne

Studium

Oktober 1993 - März 1999: Universität Osnabrück
Fachbereich: Biologie/Chemie
Abschluss: Diplombiologe

Werkvertrag Universität Osnabrück

April 1999 - September 1999

Praktika

März 1996 - April 1996: Zentrale Forschung, Bereich Materialforschung
Februar 1997 - April 1997: Zentrale Forschung, Bereich Biotechnologie
Bayer AG, Leverkusen

Stipendien

Juli 1996 – März 1999 Studienstiftung des deutschen Volkes
Oktober 2000 – September 2002 Studienstiftung des deutschen Volkes

Promotion in Biochemie

Oktober 1999 - November 2002 Institut für Biochemie der Universität zu Köln
Arbeitsgruppe Herr Prof. Dr. R. Krämer