

**Osmosensorische Eigenschaften
des Glycinbetain-Transporters BetP aus
*Corynebacterium glutamicum***

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

vorgelegt von

Dirk Schiller
aus Neuwied

Köln, Februar 2004

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: 2. Februar 2004

Kurzzusammenfassung

Unter hyperosmotischem Stress akkumuliert *Corynebacterium glutamicum* kompatible Solute durch Synthese und/oder Aufnahme aus dem umgebenden Medium. Die Aufnahme der kompatiblen Solute wird durch die vier sekundären Transportproteine BetP, EctP, ProP und LcoP vermittelt. BetP katalysiert den Transport von Betain im Symport mit zwei Natriumionen und ist auf Aktivitäts- und Expressionsebene reguliert. Um die osmosensorischen und osmoregulatorischen Eigenschaften des Carriers zu untersuchen, wurde BetP gereinigt und in Proteoliposomen aus *Escherichia coli*-Phospholipiden rekonstituiert. Durch spezifische immunologische und proteolytische Analysen konnte der unidirektionale Einbau von BetP in die Liposomenmembran nachgewiesen werden. Die N- und C-terminale Extension ist im Lumen der Proteoliposomen lokalisiert. Untersuchungen zur Ionenselektivität der BetP-Aktivierung in Proteoliposomen ergaben, dass der Transporter spezifisch durch osmotisch induzierte Erhöhungen der internen Kaliumionenkonzentration aktiviert wird. Studien über die osmoregulatorischen und osmosensorischen Eigenschaften von C-terminal verkürzten BetP-Varianten lokalisierten die osmosensorische Domäne von BetP innerhalb der endständigen 25 Aminosäuren der C-terminalen Domäne. Durch ortsspezifische Mutagenese innerhalb dieser putativen Sensordomäne konnten Aminosäuren identifiziert werden, die am Mechanismus der K⁺-abhängigen BetP-Aktivierung beteiligt sind. Untersuchungen zur Osmoregulation von BetP in Proteoliposomen mit unterschiedlichen Lipidzusammensetzungen ergaben, dass die Osmostress-abhängige Aktivität von BetP durch die Lipidumgebung moduliert werden kann. Die Analysen zur Osmosensorik von BetP in Proteoliposomen wurden durch osmoregulatorische Studien der BetP-Varianten in *E. coli*- und *C. glutamicum*-Zellen untermauert.

Abstract

Corynebacterium glutamicum responds to hyperosmotic stress by synthesis and/or uptake of compatible solutes, whose transport is mediated by the four osmoregulated secondary transport systems BetP, EctP, ProP and LcoP. BetP is a Na⁺/betaine symporter and is regulated at the level of both activity and expression. To study the osmosensory and osmoregulatory properties of the carrier the protein was purified and reconstituted in *Escherichia coli* phospholipid liposomes. It was demonstrated that Na⁺ did not stimulate the carrier activation whereas K⁺ did. Therefore the osmostress-dependent activation of BetP in proteoliposomes depends solely on changes of internal K⁺ as a measure for varying external osmolalities. Immunological and proteolysis analyses showed that BetP was reconstituted in a right-side-out orientation. By functional analyses of C-terminal truncated BetP variants in proteoliposomes the osmosensory domain was identified within the last 25 amino acids of the carrier. Detailed site directed mutageneses of the sensor domain elucidated the crucial importance of specific amino acids in sensing osmotically induced changes of internal K⁺ concentrations. Osmoregulatory studies in proteoliposomes of varying lipid content revealed that the molecular mechanism of K⁺-sensing is modulated by the phospholipid surrounding. The analyses of the K⁺-dependent BetP activation in the reconstituted system were corroborated by osmoregulatory investigations of recombinant BetP proteins in cells of both *E. coli* and *C. glutamicum*.

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	13
2.1 Bakterienstämme und Plasmide	13
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 Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i>	17
2.3.3 Modifikationen von DNA.....	18
2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion.....	18
2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	18
2.3.6 DNA-Sequenzierung	19
2.3.7 Konstruktion der C-terminal verkürzten Mutante <i>BetP CΔ45</i>	19
2.3.8 Alanine scanning und Glutamat-Austauschmutanten	20
2.4 Allgemeine analytische Methoden	20
2.4.1 Proteinbestimmungen.....	20
2.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	21
2.4.3 Western-Blot-Analyse.....	21
2.4.3.1 Immunologischer Nachweis von <i>BetP</i> -Varianten	21
2.4.3.2 Orientierung von <i>StrepBetP</i> in Proteoliposomen.....	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-BetP</i> über <i>StrepTactin</i> [®] -Affinitätschromatographie	23
2.5.3 Präparation von Liposomen.....	24
2.5.4 Rekonstitution von <i>Strep-BetP</i> in Liposomen.....	24
2.5.5 Variation der Lipidzusammensetzung der Liposomenmembran	24
2.5.6 Synthese von [¹⁴ C]-Glycinbetain.....	25
2.5.7 Radiochemische Transportmessungen	25
2.5.7.1 Messungen der Glycinbetain-Aufnahme in Proteoliposomen.....	25
2.5.7.2 Messungen der Glycinbetain-Aufnahme in <i>E. coli</i> MKH13 Zellen.....	26
2.5.7.3 Messungen der Glycinbetain-Aufnahme in <i>C. glutamicum</i> DHPF.....	26
3. Ergebnisse	28
3.1 Charakterisierung der Cystein-freien <i>BetP</i> -Variante C252T	28
3.1.1 Osmoregulation von <i>BetP</i> und <i>BetP</i> C252T im Stamm <i>E. coli</i> MKH13	29
3.1.2 Osmoregulation und chemosensorische Eigenschaften von <i>BetP</i> und <i>BetP</i> C252T in Proteoliposomen aus <i>E. coli</i> Lipiden.....	30
3.1.3 Die katalytische Aktivierung von <i>BetP</i> C252T ist spezifisch für Kaliumionen. 31	
3.2 Charakterisierung C-terminal verkürzter <i>BetP</i> -Varianten	36
3.2.1 Osmoregulation von <i>BetP</i> C252T, <i>BetP</i> CΔ12, <i>BetP</i> CΔ25 und <i>BetP</i> CΔ45 in <i>E. coli</i> MKH13.....	36
3.2.2 Osmoregulation von <i>BetP</i> C252T und den C-terminal verkürzten Varianten <i>BetP</i> CΔ12, <i>BetP</i> CΔ25 und <i>BetP</i> CΔ45 in Proteoliposomen	38

3.2.3	<i>Abhängigkeit der Aktivitäten von BetP, BetP C252T BetPΔ12, BetPΔ25 und BetPΔ45 von der intraliposomalen Kaliumionenkonzentration.....</i>	39
3.2.4	<i>Bestimmung der kinetischen Parameter (K_m und V_{max}) für Betain und Na^+ von BetP und C-terminal verkürzten BetP-Varianten in Proteoliposomen.....</i>	40
3.2.5	<i>Orientierung von BetP C252T und BetP C252T CΔ25 in Proteoliposomen ...</i>	42
3.3	Ortsgerichtete Mutagenese der C-terminalen Domäne.....	45
3.3.1	<i>Alanine scanning der C-terminalen Sensordomäne.....</i>	45
3.3.2	<i>Glutamataustauschmutanten innerhalb der Sensordomäne</i>	47
3.3.3	<i>Osmoregulation C-terminaler BetP C252T Varianten in Proteoliposomen aus E. coli-Lipiden</i>	50
3.3.4	<i>Chemosensing C-terminaler BetP C252T Mutanten in Proteoliposomen aus E. coli Lipiden.....</i>	52
3.4	Osmoregulation von BetP in Abhängigkeit der Membranumgebung.....	54
3.4.1	<i>Apparente Natriumionenaffinitäten verschiedener C-terminaler Mutanten in E. coli MKH13 und C. glutamicum DHPF.....</i>	54
3.4.2	<i>Expression von Plasmid-kodierten BetP C252T Varianten in den Stämmen E. coli MKH13 und C. glutamicum DHPF.....</i>	57
3.4.3	<i>Osmoregulation von BetP-Varianten im Stamm C. glutamicum DHPF.....</i>	58
3.4.4	<i>Osmoregulation verschiedener BetP-Varianten in Liposomen variierender Phospholipidzusammensetzungen.....</i>	59
4.	Diskussion.....	66
5.	Zusammenfassung.....	82
6.	Literatur	83

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
Cm ^R	Resistenz gegen Chloramphenicol
CSPD	
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-Glycerol-3-Phosphocholin
DOPE	1,2-Dioleoyl-sn-Glycerol-3-Phosphoethanolamin
DOPG	1,2-Dioleoyl-sn-Glycerol-3-Phosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
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
Mes	Morpholinoethansulfonsäure
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>tetA</i>	Tetracyclin-Resistenzgen
TG	Trockengewicht

Abkürzungen

Tris	2-Amino-Hydroxymethylpropan-1,3-Diol
üN	Übernacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit

1. Einleitung

Die meisten lebenden Zellen sind in der Lage ihren Wassergehalt, ihr Zellvolumen und, falls vorhanden, ihren Turgor trotz schwankender extrazellulärer Osmolalitäten zu regulieren. Die Fähigkeit zur Anpassung von Zellen an variierende externe osmotische Gegebenheiten nennt man Osmoregulation (Brown *et al.*, 1986). Osmoregulation erleichtert Wachstum und Überleben von einzelligen Pro- und Eukaryoten in natürlichen und künstlichen Habitaten (Boden, Salzwasser, Darm). So sind beispielsweise Bodenbakterien wie *Bacillus subtilis* und *Corynebacterium glutamicum* durch klimatische Änderungen (Regen, Hitzeperioden) starken Schwankungen in der externen Osmolalität ausgesetzt (Bremer und Krämer, 2000). Pathogene *E. coli*-Stämme verursachen durch ihre Fähigkeit zur Osmoregulation Blasen- oder Nierenentzündungen beim Menschen (Culham *et al.*, 1998 und 2001). Bei der industriell bedeutenden Produktion von Aminosäuren sind Produktionsstämme von *C. glutamicum* während des gesamten Fermentationsprozesses hohen extrazellulären Osmolalitäten ausgesetzt (Krämer, 1994). Bei Säugetieren begegnen Nierenzellen bei der Konzentrierung des Harns hohen osmotischen Gradienten (Orlowski und Grinstein 1997). Darüber hinaus dienen osmotisch bedingte Änderungen des Zellurgors in Pflanzen- und vermutlich auch in Bakterienzellen als Signal zur Zellwandsynthese und Zellelongation (Koch, 1983; Chater und Nikaido, 1999). Osmoregulation ist somit ein grundlegendes biologisches Phänomen, dessen Verständnis von wissenschaftlicher, medizinischer und wirtschaftlicher Bedeutung ist.

Zur Regulation ihres Wassergehalts müssen Zellen Mechanismen entwickelt haben, lebensbedrohliche Änderungen der externen oder internen Osmolalität wahrzunehmen und diesen so zu begegnen, dass Zellwachstum und Zellproliferation nicht nachhaltig beeinträchtigt werden. Für einen einzelligen pro- oder eukaryotischen Organismus haben Änderungen der externen Osmolalität auf Grund der freien Permeabilität der Cytoplasmamembran für Wasser direkte Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel. Daher kontrollieren Mikroorganismen ihren zellulären Wassergehalt durch aktive Kontrolle des zellinternen Pools an osmotisch wirksamen Substanzen. Dies geschieht über Osmose. Hierbei diffundiert das Wasser durch die Membran stets vom Kompartiment höheren Wasserpotenzials zum Kompartiment niedrigeren Wasserpotenzials.

Folgende physikalische Parameter liegen diesem Phänomen zu Grunde: Der osmotische Druck einer Lösung ist abhängig von der Wasseraktivität und steht mit dieser nach folgender Formel (1) in Beziehung:

$$\Pi = -(RT/V_w) \ln a_w \quad (1)$$

Hierbei ist Π der osmotische Druck, R die allgemeine Gaskonstante, T die absolute Temperatur in Kelvin, V_w das partielle molare Volumen des Wassers und a_w die Wasseraktivität. Dies bedeutet, dass der osmotische Druck einer Lösung um so höher ist, je geringer die Wasseraktivität der Lösung ist. In der Praxis wird der osmotische Druck einer Lösung durch deren Osmolalität beschrieben:

$$\text{Osmolalität} = \Pi / RT \quad [\text{osmol/kg}] \quad (2)$$

Weiterhin kann der osmotische Druck einer Lösung näherungsweise durch die Osmolarität, d.h., durch die Summe der Konzentrationen aller osmotischen wirksamen Teilchen, ausgedrückt werden:

$$\text{Osmolarität} = \sum_i c_i \approx \Pi / RT \quad [\text{osmol/l}] \quad (3)$$

Gelöste Teilchen (Ionen, Zucker, Aminosäuren etc.) üben einen unterschiedlichen Einfluss auf die Wasseraktivität und somit auf den osmotischen Druck einer Lösung aus. Dies erklärt, warum die gemessenen Osmolalitäten von Lösungen mit gleicher Konzentration unterschiedlicher Teilchen verschiedene Osmolalitäten haben können.

In der Regel ist die Konzentration an osmotisch wirksamen Teilchen im Cytoplasma höher als im umgebenden Medium. Dies hat zur Folge, dass das Wasserpotenzial im umgebenden Medium höher ist als im Zellinneren. Daher diffundiert Wasser seinem chemischen Gradienten folgend ins Cytoplasma der Zelle. Hierbei entsteht ein hydrostatischer Druck, der die Cytoplasmamembran gegen die Zellwand drückt und dem einströmenden Wasser entgegenwirkt. Der Turgor ist die resultierende Druckdifferenz über der Zellmembran bzw., genauer gesagt, über der Zellwand und hält die unterschiedlichen internen und externen osmotischen Drücke (Osmolalitäten) im Gleichgewicht, so dass kein Nettofluss von Wasser über die Membran beobachtet werden kann. Die Einhaltung des Turgors innerhalb physiologischer Grenzen ist essentiell für die Lebensfähigkeit und für das Wachstum von Zellen (Koch, 1983). In Gram-negativen Bakterien beträgt der Turgor 1-5 atm und in Gram-positiven Bakterien 15-25 atm (Poolman & Glaasker, 1998).

Mikroorganismen besitzen keine Systeme für einen aktiven Wassertransport. Allerdings sind bei einigen Bakterienspezies sogenannte Aquaporine beschrieben worden (Calmita *et al.*, 1995; Agre *et al.*, 1993; Hohmann *et al.*, 2000). Diese Wasserkanäle ermöglichen die erleichterte Diffusion von Wasser durch die Membran, sind zum Überleben unter variierenden osmotischen Bedingungen allerdings nicht essentiell (Delamarche *et al.*, 1999).

Osmotischer Stress

Je nachdem, wie groß die Differenz der osmotischen Drücke des umgebenden Mediums und des Cytoplasmas ist, erfährt der Organismus einen unterschiedlich hohen osmotischen Stress. Hierbei kann zwischen hyper- und hypoosmotischem Stress unterschieden werden. Bei einem hypoosmotischen Stress diffundiert Wasser in die Zelle hinein und erhöht den Turgor. Das Zellvolumen vergrößert sich, und die Zellhülle wird unter Umständen zerstört. Im Gegensatz dazu diffundiert Wasser unter hyperosmotischem Stress aus dem Cytoplasma ins umgebende Medium und der Turgor wird erniedrigt. Je nach Ausmaß des hyperosmotischen Schocks, löst sich die Zellmembran von der Zellwand ab und die Zellen plasmolysieren. Beide Zustände beeinträchtigen die Lebensfähigkeit der Bakterien.

Um der Zerstörung der Zellhülle unter hypoosmotischen Bedingungen zu entgehen, werden interne Solute über mechanosensitive Kanäle ins Medium entlassen, um durch Erniedrigung der internen Osmolalität dem Wassereinstrom entgegenzuwirken. In *E. coli* wird der relativ unspezifische Efflux von Soluten durch drei mechanosensitive Kanäle (MscL, MscS und MscM) vermittelt, die sich in ihrer Leitfähigkeit und in ihrer Aktivierungsschwelle unterscheiden (Berrier *et al.*, 1996). *C. glutamicum* ist ebenfalls mit mindestens drei mechanosensitiven Kanälen ausgestattet (Abb. 1), die einen spezifischen Efflux von Glycinbetain und Prolin, sowie im geringeren Ausmaß von Kationen gewährleisten (Ruffert *et al.*, 1997, 1999; Nottebrock *et al.*, 2003). Zwei dieser Kanäle gehören zur MscL- bzw. MscS (YggB)-Familie, die beide erstmalig in *E. coli* beschrieben wurden (Sukharev *et al.*, 1994; Levina *et al.*, 1999). Das dritte System ist nicht näher biochemisch charakterisiert. Seine Existenz liegt jedoch darin begründet, dass nach Deletion der Gene *mscL* und *mscS* (*yggB*) in *C. glutamicum* immer noch eine mechanosensitive Kanalaktivität gemessen werden konnte. Darüber hinaus konnten mechanosensitive Kanäle bei *Lactobacillus plantarum* (Glaasker *et al.*, 1996), *B. subtilis* (Moe *et al.*, 1998), *Mycobacterium tuberculosis* (Sukharev *et al.*, 2001), sowie in Eukaryoten nachgewiesen werden (Morris, 1990). Das ubiquitäre Vorkommen solcher Kanäle unterstreicht die physiologische Notwendigkeit einzelliger Organismen auf plötzliche Erniedrigungen der externen Osmolalität schnell und effizient reagieren zu können.

Im Gegensatz dazu werden unter hyperosmotischen Bedingungen kompatible Solute durch Aufnahme und/oder Synthese im Cytoplasma akkumuliert. Kompatible Solute sind polare, hydrophile und bei physiologischem pH ungeladene organische Moleküle, die in molaren cytoplasmatischen Konzentrationen akkumuliert werden können, ohne die Physiologie der Zelle zu beeinflussen. Darüber hinaus wirken sie kosmotrop, d.h., sie stabilisieren native Proteinkonformationen, indem sie nach dem Modell der *preferential exclusion* nicht mit der Hydrathülle von Proteinen wechselwirken, sondern, im Gegenteil, die kohäsiven Bindung der Wassermoleküle der Hydrathülle verstärken (Timasheff, 1992). Zur Wiedereinstellung des Zellurgors nach einem hyperosmotischen Schock sind sie daher gut geeignet (Yancey *et al.*, 1982; Wood, 1999). Typische Vertreter der kompatiblen Solute sind Methylamine (Trimethylaminoxid, Glycinbetain), Zucker (Trehalose) und Aminosäuren und deren Derivate (Prolin, Glutamat, Ectoin).

Akkumulation von kompatiblen Soluten

Die Synthese von kompatiblen Soluten ermöglicht die Adaptation an hyperosmotische Bedingungen. So wird unter hyperosmotischem Stress eine *de novo* Synthese von Prolin bei *C. glutamicum*, *B. subtilis* und *E. coli* beobachtet (Whatmore *et al.*, 1990; Rönsch, 2000; Ley, 2001). Eine Akkumulation (durch Synthese) von Glutamat, Glutamin und Trehalose konnte ebenfalls gezeigt werden (Whatmore *et al.*, 1990; Burger, 2002; Rönsch *et al.*, 2003). In *C. glutamicum* ist bei Stickstoffüberschuss Prolin das wichtigste kompatible Solut, dessen Biosynthese-Enzyme *proA*, *proB* und *proC* sowohl auf Aktivitäts-, als auch auf Expressionsebene reguliert werden (Ley, 2001). Unter Stickstofflimitierenden Bedingungen wird in *C. glutamicum* Trehalose als wichtigste osmoprotektive Substanz synthetisiert (Wolf *et al.*, 2003) (Abb. 1). In der Regel sind die Enzyme zur Synthese von kompatiblen Soluten auf Aktivitätsebene reguliert, können aber auch auf Expressionsebene reguliert sein (Killham und Firestone, 1984; Galinski und Trüper, 1994).

Die Aufnahme von kompatiblen Soluten aus dem umgebenden Medium ist gegenüber der *de novo* Synthese favorisiert, da sie zum einen schneller erfolgt und zum anderen der Energieaufwand der Zelle zur Akkumulation von kompatiblen Soluten über Transportsysteme im Vergleich zur Biosynthese geringer ist. Die Verfügbarkeit von kompatiblen Soluten im natürlichen Habitat wird durch organisches Material, das über Pflanzen, Tiere und Mikroorganismen eingetragen wird, gewährleistet (Galinski und Trüper 1994; Ventosa *et al.*, 1998). Für die Aufnahme von kompatiblen Soluten besitzen Bakterienzellen in der Regel mehrere osmotisch regulierte Transportsysteme. Diese zeichnen sich durch eine hohe Affinität

zu ihrem jeweiligen Substrat aus. Darüber hinaus unterscheiden sich die einzelnen Carrier in ihrem Substratspektrum. Durch die Möglichkeit unter hyperosmotischen Bedingungen verschiedene kompatible Solute aufnehmen zu können, wird eine schnelle und flexible Adaptation unter plötzlich auftretenden hyperosmotischen Bedingungen gewährleistet (May *et al.*, 1986; Milner *et al.*, 1988; Wood, 1999).

Osmotisch regulierte Aufnahmesysteme finden sich in allen Transporterfamilien. Zu den ATP-abhängigen ABC-Transportern zählen beispielsweise OpuA aus *Lactococcus lactis* (van der Heide und Poolman, 2000a), OpuA, OpuB und OpuC aus *Bacillus subtilis* (Kappes *et al.*, 1998 und 1999) und ProU aus *E. coli* (Sutherland *et al.*, 1986). TeaABC aus *Halomonas elongata* ist ein sekundärer Transporter, dessen Substrataufnahme von einem Bindeprotein abhängig ist (Grammann *et al.*, 2002). Zu den prominentesten osmoregulatorischen sekundären Transportern zählen die Natrium-Symporter EctP und BetP aus *C. glutamicum* (Farwick *et al.*, 1995; Peter *et al.*, 1998a), sowie der Protonen-Symporter ProP aus *E. coli* (Grothe *et al.*, 1986).

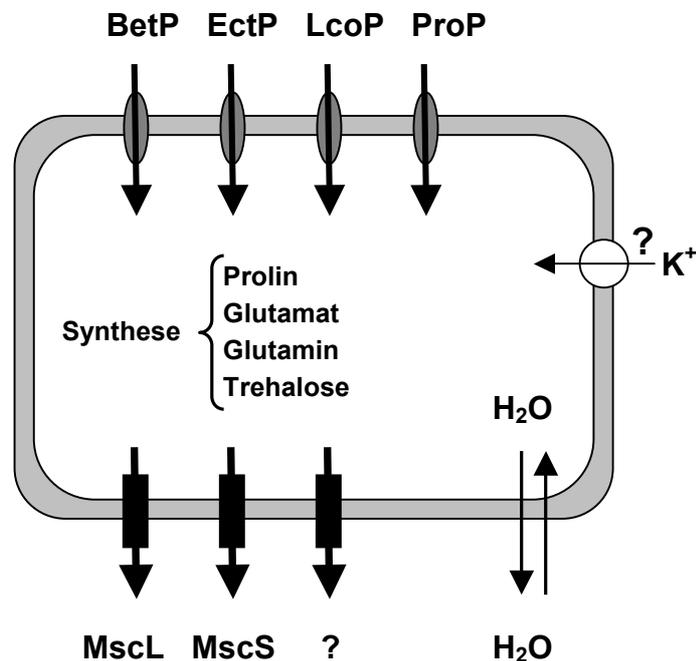


Abb. 1: Osmoregulation von *C. glutamicum*. Gezeigt sind Transportsysteme, die an der Osmoregulation von *C. glutamicum* beteiligt sind. Die Akkumulation von kompatiblen Soluten unter hyperosmotischen Bedingungen erfolgt durch die sekundären Carrier BetP, EctP, LcoP und ProP und/oder durch endogene Synthese. Die Ausschleusung von Ionen und kompatiblen Soluten unter hypoosmotischen Bedingungen erfolgt über mindestens drei mechanosensitive Kanäle (MscL, MscS, Msc ?). Weitere Einzelheiten siehe Text.

Während das Bodenbakterium *B. subtilis* mindestens fünf Aufnahmesysteme besitzt, die ein breites Substratspektrum mit mehr als zwölf verschiedenen kompatiblen Soluten gewährleisten (Kempf und Bremer, 1995; Kappes und Bremer, 1998), erfolgt die Aufnahme von kompatiblen Soluten in *C. glutamicum* ausschließlich über sekundäre Na⁺- oder H⁺-gekoppelte Carrier (Peter *et al.*, 1996 und 1998a; Steger, 2002) (Abb. 1 und Tab. 1).

Tab. 1: Aufnahmesysteme für kompatible Solute in *C. glutamicum* nach Peter *et al.*, 1996,1997 und 1998 und Steger, 2002.

Transporter (Familie)	Substrat/Co- Substrat	K_m für Substrat [μM]	V_{max} [nmol/(min*mg TG)]	osmotisch reguliert ?
BetP (BCCT)	Betain/Na ⁺	8,6 \pm 0,4	110	ja
EctP (BCCT)	Ectoin/Na ⁺	63 \pm 4,9	27	ja
	Betain/Na ⁺	333 \pm 45	34	
	Prolin/Na ⁺	1200 \pm 180	34	
LcoP (BCCT)	Betain/Na ⁺	154 \pm 15	8,5	ja
	Ectoin/Na ⁺	539 \pm 41	8,6	
ProP (MFS)	Prolin/H ⁺	48	71	ja
	Ectoin/H ⁺	132	129	
PutP (SSS)	Prolin/Na ⁺	7,6	20	nein

Abkürzungen: BCCT (Betain-Carnitin-Cholin-Transporter), MFS (major facilitator superfamily), SSS (sodium/solute symporter).

ProP gehört zur MFS-Familie (major facilitator superfamily) und katalysiert die Aufnahme von Prolin und Ectoin. LcoP, EctP und BetP werden der sogenannten BCCT-Familie (Betain/Carnitin/Cholin-Transporter) (Saier *et al.*, 1999) zugeordnet und vermitteln die Na⁺-gekoppelte Aufnahme von Glycinbetain, Ectoin und Prolin. Im Gegensatz zu BetP, das ausschließlich die Aufnahme von Glycinbetain katalysiert, zeichnen sich die übrigen Transporter durch ein erweitertes Substratspektrum aus. Die Regulation der Carrier erfolgt sowohl auf Aktivitätsebene (Farwick *et al.*, 1995; Peter *et al.*, 1998a), als auch auf Expressionsebene (unveröffentlichte Daten).

Die zelluläre Reaktion auf einen hyperosmotischen Schock

Die Reaktion von Bakterienzellen auf einen hyperosmotischen Schock lässt sich in ihrer zeitlichen Abfolge am Beispiel von *E. coli*, den in seiner Reaktion auf osmotischen Stress am besten untersuchten Organismus, folgendermaßen darstellen (Wood, 1999).

Nach einem hyperosmotischen Schock werden in *E. coli* zunächst Kaliumionen durch die Aktivität von K⁺-Aufnahmesystemen (TrkG, TrkH, Kdp, Kup) akkumuliert (Dinnbier *et al.*, 1988; McLaggan *et al.*, 1994). Zum Ausgleich der hohen internen positiven Ladung werden Putrescin und Protonen heraustransportiert (Munro *et al.*, 1972; Dinnbier *et al.*, 1988; Schiller *et al.*, 2000). Bereits nach 1 Minute beginnt die *de novo*-Synthese von Glutamat (Cayley *et al.*, 1991; McLaggan *et al.*, 1994) ebenso wie die Aufnahme von Prolin und Glycinbetain durch die Transporter ProP und ProU. Anschließend werden kompatible Solute synthetisiert und Kaliumglutamat als osmoprotektive Substanz ersetzt. Außerdem werden osmotisch regulierte Gene für Transportsysteme wie z.B. *proP*, *proU*, *kdpFABC* und *betT* exprimiert. Zudem ist *E. coli* zur *de novo* Synthese von Trehalose fähig (Dinnbier *et al.*, 1988; Strøm und Kaasen, 1993). Bereits nach einer Stunde (abhängig vom Ausmaß des hyperosmotischen Schocks) stellen sich Zellwachstum und Zellproliferation wieder ein.

Im Gegensatz zu *E. coli* sind die Reaktionen von Gram-positiven Bakterien auf osmotischen Stress weniger intensiv untersucht. Unter hyperosmotischen Bedingungen akkumuliert *B. subtilis* Kaliumionen, Prolin und Glycinbetain. Die kompatiblen Solute werden sowohl durch Aufnahme als auch durch *de novo* Synthese angereichert (Kempf und Bremer, 1998). Für *C. glutamicum* wurde ebenfalls eine K⁺-Akkumulation beschrieben (Wolf *et al.*, 2003, unveröffentlichte Daten). Allerdings konnte bisher kein Aufnahmesystem für Kaliumionen identifiziert werden. Neben Kaliumionen werden Glutamat und Glutamin akkumuliert (Burger, 2002). Eine zum Ladungsausgleich notwendige Exkretion von Putrescin, wie in *E. coli* beobachtet, konnte nicht beobachtet werden (Schiller, 2000).

Osmosensoren detektieren osmotischen Stress

Die Wahrnehmung eines hypoosmotischen Schocks muss direkt und unmittelbar erfolgen, da die schnelle Zunahme des Zellvolumens durch den schnellen Wassereinstrom zur Zerstörung der Zellhülle führen kann. Zur Verminderung der internen Osmolalität entlässt die Zelle kompatible Solute und Ionen über mechanosensitive Kanäle ins Medium. Diese Kanäle nehmen osmotischen Stress als Folge der lateralen Expansion der Cytoplasmamembran wahr und werden in Abhängigkeit der Membranspannung geöffnet oder wieder geschlossen (Levina *et al.*, 1999; Sukharev *et al.*, 2001).

Im Gegensatz dazu ist der Mechanismus zur Wahrnehmung von hyperosmotischen Stressbedingungen weniger gut verstanden. Interessanterweise sind alle bisher identifizierten osmosensorischen Proteine Membran-gebunden. Verschiedene physikalische Parameter werden als putative Stimuli für osmosensorische Membranproteine diskutiert (Wood, 1999, Morbach und Krämer, 2002). Hierzu zählen Änderungen der Membranspannung, des Turgors, der internen oder externen Osmolalität durch Variation der Ionen- oder Solutkonzentration, die Wahrnehmung eines osmotischen Gradienten über der Zellmembran oder *macromolecular crowding*. Unter *macromolecular crowding* versteht man die schwachen und unspezifischen Interaktionen von Proteinen mit weiteren Makromolekülen im Cytoplasma. Diese Wechselwirkungen können durch osmotisch bedingte Wasserflüsse über die Zellmembran beeinflusst werden (Garner und Burg, 1994). Bei einem hyperosmotischen Schock ändern sich durch den sofortigen Wasserausstrom aus dem Cytoplasma alle angesprochenen Parameter gleichzeitig. Somit ist die Unterscheidung, ob nur ein Stimulus oder ob mehrere Stimuli von Osmosensoren wahrgenommen werden, schwierig bzw. unter physiologischen Bedingungen unmöglich. Die Untersuchung putativer osmotischer Stimuli in Proteoliposomen erlaubt auf Grund der hohen Flexibilität dieses Systems die separate Betrachtung stimulierender Einflüsse auf einen Osmosensor. Durch freie Variation der Lipidzusammensetzung der Liposomenmembran, sowie durch Variation des intra- und/oder des extraliposomalen Puffers, war es möglich, die große Auswahl an möglichen osmotischen Stimuli einzugrenzen (Racher *et al.*, 1999 und 2001; van der Heide *et al.*, 2001; Rübenhagen *et al.*, 2001; Culham *et al.*, 2003b).

In Bakterienzellen lassen sich zwei Typen von Osmosensoren unterscheiden. Zum einen können Osmosensoren selbst Transportsysteme darstellen und werden durch einen osmotischen Stimulus direkt auf Aktivitätsebene reguliert. Zum anderen können Osmosensoren die Transkription eines osmotisch regulierten Transportsystems regulieren und wirken somit auf Expressionsebene. Letzteres kann unter anderem durch die Aktivität von Zwei-Komponenten Systemen gewährleistet werden. Hierbei wird eine membrangebundene Sensor kinase nach Aktivierung durch einen osmotischen Stimulus autophosphoryliert und überträgt diesen Phosphatrest anschließend auf den cytoplasmatischen Antwortregulator. Dieser ist in der Regel ein Transkriptionsfaktor, der die Expression der Gene für osmotisch regulierte Transporter induziert. Das EnvZ/OmpR-System ist ein Zwei-Komponenten System, das in Abhängigkeit der externen Osmolalität die Transkription der Gene für OmpF und OmpC, zwei Porine in der äußeren Membran von *E. coli*, induziert. Hierbei entscheidet das Verhältnis von phosphoryliertem zu dephosphoryliertem Regulator (OmpR) über die

Expression von *ompF* und *ompC* (Jin und Inouye, 1995; Qin *et al.*, 2001). Aktiviert wird dieses System *in vitro* hauptsächlich durch K^+ (Jung *et al.*, 2001).

Kdp ist ein ATP-abhängiges K^+ -Transportsystem in *E. coli*, das neben Trk für die unmittelbare K^+ -Aufnahme nach einem hyperosmotischen Schock verantwortlich ist (Bakker, 1993). Die Expression des *kdpFABC*-Operons, das *Kdp* codiert, wird durch das Zwei-Komponenten-System KdpD/KdpE reguliert. Die Autophosphorylierung der Sensorkinase KdpD wird hierbei durch Erhöhung der externen Osmolalität, durch Änderungen der internen Ionenstärke, sowie des internen ATP-Levels aktiviert und kontrolliert über Kinase/Phosphatase-Aktivität den Regulator KdpE, der die Transkription des K^+ -Aufnahmesystems induziert (Jung *et al.*, 2000; Jung und Altendorf, 2002). Die Kontrolle der Expression osmotisch regulierter Transportsysteme in *C. glutamicum* scheint ebenfalls über ein Zwei-Komponenten System zu erfolgen. So ist beobachtet worden, dass nach Deletion des Zwei-Komponenten-Systems MtrAB in *C. glutamicum* keine Expression der Gene für die Transportsysteme BetP, LcoP und ProP unter hyperosmotischen Bedingungen erfolgt. Allerdings sind weitere Studien darüber, ob MtrAB die Expression direkt oder indirekt reguliert, notwendig (Möker *et al.*, in Vorbereitung).

Änderungen der externen Osmolalität können die Aktivität osmotisch regulierter Transporter direkt beeinflussen. Drei Transportsysteme, denen nach Rekonstitution in Proteoliposomen sowohl osmoregulatorische, als auch osmosensorische Eigenschaften zugeschrieben werden konnten, sind bisher bekannt. Der Protonen/kompatible Solute Symporter ProP aus *E. coli* (Racher *et al.*, 1999), der ABC-Transporter OpuA aus *L. lactis* (van der Heide und Poolman, 2000) und BetP aus *C. glutamicum* (Rübenhagen *et al.*, 2000). ProP transportiert unter hyperosmotischen Bedingungen Prolin, Glycinbetain, Prolinbetain, Ectoin und weitere strukturähnliche Substrate im Symport mit Protonen in die Zelle. Der Carrier besteht aus zwölf Transmembransegmenten und einer N- und C-terminalen Extension, die vermutlich jeweils im Cytoplasma lokalisiert sind (Culham *et al.*, 2003a). ProP war der erste Transporter, dem im rekonstituierten System osmosensorische und osmoregulatorische Eigenschaften nachgewiesen werden konnten. Die C-terminale Domäne ist in der Lage, ein sogenanntes *coiled coil*-Motiv auszubilden. Die Ausbildung dieser Domäne ist wichtig für die Osmoregulation und möglicherweise für die Wahrnehmung osmotischer Stimuli (Culham *et al.*, 2000). ProP wird durch interne Konzentrationserhöhungen von Kaliumionen und durch *macromolecular crowding*, das in Proteoliposomen durch die Verwendung von Polyethylenglycol (PEG) unterschiedlicher Kettenlänge imitiert wurde, aktiviert (Racher *et*

al., 2001; Culham *et al.*, 2003b). Darüber hinaus ist zur vollen Aktivität des Carriers *in vivo* die Anwesenheit des cytoplasmatischen Proteins ProQ notwendig (Kunte *et al.*, 1999).

OpuA ist ein Bindeprotein-abhängiger ABC-Transporter aus *L. lactis* und benötigt für seine katalytische Funktion die Energie aus der Hydrolyse von ATP. OpuA wird im rekonstituierten System durch Erhöhung der internen Ionenstärke aktiviert, genauer gesagt, durch den Einfluss osmotisch induzierter Änderungen der internen Ionenkonzentration auf die OpuA umgebende Membran (van der Heide *et al.*, 2001). Somit wird als osmotischer Stimulus der OpuA-Aktivierung die Interaktion des Proteins mit der Membran, deren physikalische Eigenschaften durch die interne Ionenstärke beeinflusst wird, vorgeschlagen. Unterstützt wurde diese Hypothese durch den Einfluss unterschiedlich geladener amphipathischer Reagenzien, die die physikalischen Eigenschaften der Membran modulieren und dadurch die osmotisch regulierte Aktivität von OpuA beeinflussen.

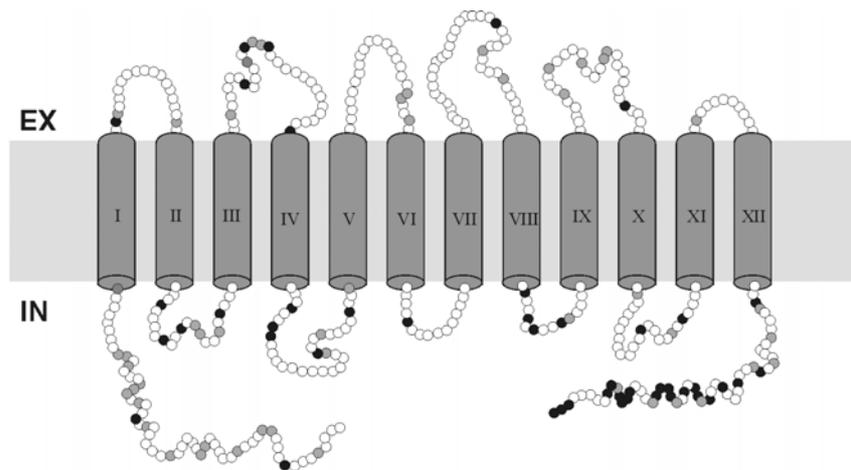


Abb. 2: Topologiemodell von BetP. Die Topologievorhersage wurde mit dem Programm PHDThtm durchgeführt (Rübenhagen, 2001). Die N- und C-terminale Extension sind jeweils im Cytoplasma lokalisiert. BetP besitzt 12 Transmembransegmente. Die positiv geladenen Aminosäurereste sind schwarz, negativ geladene Aminosäurereste sind grau dargestellt.

Der osmotisch regulierte sekundäre Carrier BetP aus *C. glutamicum* nimmt unter hyperosmotischen Bedingungen Betain im Symport mit zwei Natriumionen auf. Die interne Akkumulation von Betain kann hierbei bis zu einem Gradienten von $4 \cdot 10^6$ (in/ex) erfolgen (Farwick *et al.*, 1995). Die Computer-gestützte Vorhersage der Topologie des Carriers beschreibt BetP als ein Membranprotein mit zwölf Transmembransegmenten, die durch externe bzw. interne Schleifen miteinander verbunden sind. Die N- und C-terminalen

Extensionen haben eine Länge von 55-60 Aminosäuren, sind geladen und jeweils im Cytoplasma lokalisiert (Rübenhagen *et al.*, 2001) (Abb. 2). BetP besteht aus 595 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 64,2 kDa. Im rekonstituierten System wird BetP durch eine interne Erhöhung an Kaliumionen (oder Cs⁺ und Rb⁺) aktiviert (Rübenhagen *et al.*, 2001). Das Lokalanästhetikum Tetracain war ebenfalls in der Lage BetP unter isoosmotischen Bedingungen in einem geringen Ausmaß zu aktivieren (Rübenhagen *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu OpuA und ProP zeichnet sich BetP durch eine äußerst schnelle Aktivierung (<1 Sekunde) sowohl in Zellen, als auch in Proteoliposomen aus. Kryoelektronenmikroskopische Untersuchungen zweidimensionaler Kristalle von BetP, sowie Gleichgewichtsuptrazentrifugationen vom solubilisierten Carrier lassen darauf schließen, dass BetP sowohl im kristallinen, als auch im solubilisierten Zustand als Trimer vorliegt. Somit ist zu vermuten, dass die funktionelle Einheit von BetP in der nativen Membrenumgebung ein Trimer ist (Ziegler *et al.*, unveröffentlichte Daten).

Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollte die Rolle der C-terminalen Extension bei der Wahrnehmung von osmotischem Stress untersucht werden. Erste Hinweise auf eine Beteiligung dieser Proteinstruktur in der osmotisch regulierten Aktivität von BetP kamen von der Beobachtung, dass der Schwellenwert der BetP-Aktivierung bei N-terminal verkürzten BetP-Varianten zu höheren Osmolalitäten verschoben war, während Verkürzungen der C-terminalen Extension zu einem deregulierten osmotischen Aktivitätsprofil in *C. glutamicum* führten (Peter *et al.*, 1998b). Die Rekonstitution C-terminal verkürzter BetP-Proteine in Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden sollte Aufschluss darüber geben, ob die C-terminale Extension direkt in der Wahrnehmung des osmotischen Stimulus, nämlich der Erhöhung der internen Kaliumionenkonzentration nach einem hyperosmotischen Schock, involviert ist. Weiterhin sollten durch ortsspezifische Mutagenese Aminosäuren innerhalb der C-terminalen Extension identifiziert werden, die für die Wahrnehmung und Verarbeitung von osmotischem Stress durch BetP verantwortlich sind. Voraussetzung für diese Fragestellung war die Aufklärung der Orientierung von BetP in Proteoliposomen. Der direkte Vergleich der osmotischen Aktivierung von BetP in *E. coli*- und *C. glutamicum*-Zellen mit den im Proteoliposomensystem erhaltenen Daten sollte zur Überprüfung des Messsystems dienen und zugleich die mögliche physiologische Relevanz der *in vitro*-Ergebnisse unterstreichen. Darüber hinaus musste zur weiteren Spezifizierung der molekularen Wahrnehmung von osmotischen Stimuli die Ionenselektivität des Carriers weiter eingegrenzt werden.

2. Material und Methoden

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

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

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

Tabelle 2: Eigenschaften der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp, Charakteristika	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α mcr	<i>endA1 supE44 thi-1λ recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF) U169 Φ80dlacZΔM15 mcrA Δ(mrr hsdRMS mcrBC)</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
JM109	<i>F' traD36 lacI^q Δ(lacZ)M15 proA B / e14⁻ (McrA⁻) Δ(lac-proAB) 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 Δ(putPA)101 Δ(proP)2 Δ(proU)</i>	Haardt <i>et al.</i> , 1995
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	Wildtyp	Abe <i>et al.</i> , 1967
DHPE	ATCC 13032 (Δ betP, Δ proP, Δ putP, Δ ectP)	Peter <i>et al.</i> , 1996
DHPF	ATCC 13032 (Δ betP, Δ proP, Δ putP, Δ ectP, Δ lcoP)	diese Arbeit

Tabelle 3: Eigenschaften der verwendeten Plasmide

Plasmid	Resistenz	Eigenschaften	Referenz
pASK-IBA5 <i>betP</i>	Amp ^R	pASK-IBA5 mit <i>betP</i> in der BsaI/HindIII Schnittstelle; N-terminal: StrepTagII	Rübenhagen <i>et al.</i> , 2000
pAcl1	Amp ^R	pASK-IBA5 <i>betP</i> C252T	Rübenhagen <i>et al.</i> , 2001
pAcl1 BetP CΔ12	"	12 C-terminale AS deletiert	Rübenhagen, Dissertation 2001
pAcl1 BetP CΔ23	"	23 C-terminale AS deletiert	"
pAcl1 BetP CΔ45	"	45 C-terminale AS deletiert	diese Arbeit
pAcl1 BetP CΔ52	"	52 C-terminale AS deletiert	Rübenhagen, Dissertation 2001
pAcl1 572 AAA	"	pAcl mit E572A, H573A, R574A	diese Arbeit
pAcl1 575 AAA	"	pAcl mit K575A, R576A, E577A	"
pAcl1 578 AAA	"	pAcl mit L578A, A579A, A580A	"
pAcl1 581 AAA	"	pAcl mit K581A, R582A, R583A	"
pAcl1 584 AAA	"	pAcl mit R584A, E585A, R586A	"
pAcl1 587 AAA	"	pAcl mit K587A, A588A, S589A	"
pAcl1 590 AAA	"	pAcl mit G590A, A591A, G592A	"
pAcl1 593 AAA	"	pAcl mit K593A, R594A, R595A	"
pAcl1 E572Q	"	pAcl1 mit Codonaustausch	"
pAcl1 E577Q	"	pAcl1 mit Codonaustausch	"
pAcl1 E585Q	"	pAcl1 mit Codonaustausch	"
pAcl1 E577/585Q	"	pAcl1 mit zwei Codonaustausche	"
pAcl1 E572/577/585Q	"	pAcl1 mit drei Codonaustausche	"
pAcl1 E572K	"	pAcl1 mit Codonaustausch	"
pAcl1 E572D	"	pAcl1 mit Codonaustausch	"
pAcl1 E572C	"	pAcl1 mit Codonaustausch	"
PXMJ19	Cm ^R	<i>Ptac, lacI^q</i>	Jakoby <i>et al.</i> , 1999
PXMJ19 <i>betP</i> C252T	"	PXMJ19 mit <i>betP</i> C252T	diese Arbeit
PXMJ19 CΔ 25	"	PXMJ19 mit <i>betP</i> C252T CΔ25	"
PXMJ19 E572Q	"	PXMJ19 mit <i>betP</i> C252T E572Q	"
PXMJ19 E572K	"	PXMJ19 mit <i>betP</i> C252T E572K	"
PXMJ19 E572D	"	PXMJ19 mit <i>betP</i> C252T E572D	"
PXMJ19 E572C	"	PXMJ19 mit <i>betP</i> C252T E572C	"
PXMJ19 572AAA	"	PXMJ19 mit E572A, H573A, R574A	"
PXMJ19 E572/577/585Q	"	PXMJ19 mit drei Codonaustausche	"

Tab. 4: Verwendete Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese

Oligonukleotide	Sequenz (5'-3')
572 AAA s	CGTCGTGTTTACAATGCAGCCGCCAAGCGTGAAGTGGCT
572 AAA as	AGCCAGTTCACGCTTGGCGGCTGCATTGTGAACACGACG
575 AAA s	CACAATGAACACCGCGCGGCGGCGACTGGCTGCAAAGCGA
575 AAA as	TCGCTTTGCAGCCAGTGCCGCCGCGCGGTGTTTATTGTG
578 AAA s	CACCGCAAGCGTGAAGCGGCTGCAAAGCGACGCAGGGAG
578 AAA as	CTCCCTGCGTCGCTTTGCAGCCGCTTACGCTTGCGGTG
581 AAA s	CGTGAAGTGGCTGCAGCGGCAGCCAGGGAGCGTAAGGCG
581 AAA as	CGCCTTACGCTCCCTGGCTGCCGCTGCAGCCAGTTCACG
584 AAA s	GCTGCAAAGCGACGCGCGGCGGCTAAGGCGAGTGGCGCG
584 AAA as	CGCGCCACTCGCTTAGCCGCCGCGCGTTCGCTTTGCAGC
587 AAA s	CGACGCAGGGAGCGTGCAGCGGCTGGCGCGGGGAAGCGT
587 AAA as	ACGCTTCCCCGCGCCAGCCGCCGACGCTCCCTGCGTTCG
590 AAA s	GAGCGTAAGGCGAGTGCCGCGGCGAAGCGTCGATAGAAG
590 AAA as	CTTCTATCGACGCTTCGCCGCGGCGACTCGCCTTACGCTC
593 AAA s	GCGAGTGGCGCGGGGGCGGCTGCATAGAAGCTTGACCTG
593 AAA as	CAGGTCAAGCTTCTATGCAGCCGCCCGCGCCACTCGC
E572Q s	CGTCGTGTTTACAATCAACACCGCAAGCGTGAA
E572Q as	TTCACGCTTGCGGTGTGATTGTGAACACGACG
E577Q s	GAACACCGCAAGCGTCAACTGGCTGCAAAGCGA
E577Q as	TCGCTTTGCAGCCAGTTGACGCTTGCGGTGTTC
E585Q s	GCAAAGCGACGCAGGCAGCGTAAGGCGAGTGGC
E585Q as	GCCACTCGCCTTACGCTGCCTGCGTTCGCTTTGC
E577/585Qs	GCAAAGCGACGCAGGCAGCGTAAGGCGAGTGGC
E577/585Qas	GCCACTCGCCTTACGCTGCCTGCGTTCGCTTTGC
E572/577/585Qs	CGTCGTGTTTACAATCAACACCGCAAGCGTGAA
E572/577/585Qas	TTCACGCTTGCGGTGTGATTGTGAACACGACG
E572Ks	CGTCGTGTTTACAATAAGCACCGCAAGCGTGAA
E572Kas	TTCACGCTTGCGGTGTGATTGTGAACACGACG
E572Ds	CGTCGTGTTTACAATGACCACCGCAAGCGTGAA
E572Das	TTCACGCTTGCGGTGGTCATTGTGAACACGACG
E572Cs	CGTCGTGTTTACAATTGCCACCGCAAGCGTGAA
E572Cas	TTCACGCTTGCGGTGGCAATTGTGAACACGACG

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 16 g/l Bacto Agar zugesetzt. Die Anzucht zur Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte auf SOB-Medium (2% Bacto Trypton, 0,5% Bacto Yeast Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂) (Hanahan, 1985). Nach der Transformation wurden die Zellen in das Regenerationsmedium SOC (SOB mit 20 mM Glucose) (Hanahan, 1985) überführt.

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

2.2.3 Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung von *E. coli*-Zellen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, aerob bei 37°C und 125 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 (60% Endkonzentration) versetzt. Die Lagerung erfolgte kurzzeitig bei -20°C und 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 und JM109 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 bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. 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 µg/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 OD₅₅₀ 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 MgCl₂) 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 bei 130rpm geschüttelt. 200 µl des Ansatzes wurden auf LB-Agar-Platten (50 µg/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.

2.3.2 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 für mindestens

60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Volumen der folgenden Puffer P2 und P3 wurden ebenfalls verdoppelt. Der optionale Waschschrift in der Herstellervorschrift wurde grundsätzlich durchgeführt. Die mit den genannten Methoden isolierte Plasmid-DNA konnte direkt zur Elektroporation oder zur Sequenzierung eingesetzt werden.

2.3.3 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.

2.3.4 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 BetP-Varianten verwendeten Oligodesoxynukleotide sind in Tabelle 3 dargestellt. In einem 50 µl PCR-Ansatz wurden 10 ng Plasmid-DNA (Matrize), je 250 ng Primer, 1,2 µl eines dNTP-Gemisches (je 10 mM dATP, dCTP, dTTP, dGTP; Sigma, Deisenhofen), 1 µl *PfuTurbo*[®] DNA Polymerase und 5µl des 10fach konzentrierten Polymerasepuffers gemischt und die PCR gestartet. Die gewählte Annealingtemperatur richtete sich nach dem verwendeten Primerpaar. In der Regel wurden 18 bis 30 Zyklen, bestehend aus Denaturierung, Anlagerung der Oligodesoxynukleotide und Elongation, durchgeführt. Zur Durchführung wurde der Thermocycler der Firma PE Applied Biosystems, Weiterstadt (GeneAmp[®]PCR System 9700) benutzt.

2.3.5 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). Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, wurde die DNA mit Hilfe des QIAquick-Kits (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

2.3.6 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.

2.3.7 Konstruktion der C-terminal verkürzten Mutante BetP CΔ45

Zur Konstruktion der C-terminalen Mutante BetP Δ45 wurden folgende Primer verwendet:

sense-primer: 5'-TCT CTT GGT CAC CAT TCG-3' (mit BstEII Schnittstelle)

antisense primer: 5'-CGA AGC TTC TAG TAG ATC ACA TCA TTG C-3' (mit HindIII Schnittstelle).

Klonierungsstrategie:

Das PCR-Produkt dieser Primer mit dem IBA-Vektor pASK IBA5 betP C252T als *template* liefert ein 545 Basenpaare großes Fragment mit Stop-Codon. Somit wurde ein Teilstück des *betP*-Gens amplifiziert, das den C-terminalen Bereich von BetP ohne die letzten 45 Aminosäuren codiert. Das Vorhandensein einer natürlichen BstEII-Schnittstelle im *betP*-Gen ermöglichte die Insertion des amplifizierten 545 bp Produkts in der Weise, dass eine um 45 Aminosäuren C-terminal verkürzte BetP Variante codiert wird. Das mit den oben angeführten Primern amplifizierte DNA-Fragment wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen BstEII und HindIII in den Vektor pdrive ligiert. Die erfolgreiche Insertion und fehlerfreie Amplifikation wurde durch Sequenzierung überprüft. Das Fragment wurde mit Hilfe der eingeführten Schnittstellen wieder ausgeschnitten und in den mit HindIII und BstEII behandelten Vektor pASK-IBA5 *betP* C252T ligiert. Diese Ligation führte zum Plasmid pASK-IBA5 *betP* C252T CΔ45. Eine Transformation von kompetenten *E. coli* DH5α mcr mit diesem Plasmid führte zum Stamm DH5α mcr pASK-IBA5 *betP* C252T CΔ45, der für die Reinigung der C-terminal verkürzten Mutante BetP CΔ45 eingesetzt wurde.

2.3.8 *Alanine scanning* und Glutamat-Austauschmutanten

Zur Konstruktion der einzelnen Mutanten wurde eine Methode in Anlehnung des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene verwendet.

Mit Hilfe der in Tabelle 4 aufgeführten Primer, die die gewünschten Mutationen trugen und dem methylierten IBA-Vektor pASK-IBA5 *betP* C252T (Minipräparation aus *E. coli* JM109) als *template* wurden genickte Einzelstränge amplifiziert. Die methylierten *template*-Stränge wurden mit DpnI verdaut und die verbliebenen mutagenisierten PCR-Produkte, die das gesamte Plasmid umfassen, in den Stamm *E. coli* DH5 α mcr transformiert. In den Zellen wurden die *nicks* durch zelleigene Ligase verbunden und das auf diese Weise wiederhergestellte Plasmid amplifiziert. Um auszuschließen, dass während der PCR unerwünschte Basenaustausche stattgefunden haben, wurden die mutierten Sequenzen, die die letzten 45 Aminosäuren der C-terminalen Extension codieren, mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *HindIII* ausgeschnitten. Die 135 Nukleotide großen Fragmente wurden mit dem ebenfalls mit *XhoI* und *HindIII* geschnittenen und anschließend dephosphorylierten Vektor pASK-IBA5 *betP* C252T ligiert und in DH5 α mcr transformiert. In diesem Vektor ist die BetP-Sequenz vollständig sequenziert. Die erfolgreiche Ligation und fehlerfreie Amplifikation wurde durch Sequenzierung überprüft. Die auf diese Weise hergestellten Plasmide sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Transformation von kompetenten *E. coli* DH5 α mcr mit diesen Plasmiden führte zu den entsprechenden DH5 α mcr Stämmen, die für die Reinigung der einzelnen BetP C252T Mutanten eingesetzt werden. Die Transformation der einzelnen Vektoren in den für den Transport von kompatiblen Soluten defizienten Stamm *E. coli* MKH13 ermöglichte Betainaufnahmebestimmungen unter physiologischen Bedingungen.

2.4 Allgemeine analytische Methoden

2.4.1 Proteinbestimmungen

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

2.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bakterielle Proteine oder Zellextrakte aus *E. coli* und *C. glutamicum* 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 μ M β -Mercaptoethanol, Bromphenolblau) versetzt. Der direkte Nachweis der Proteine in den Gelen erfolgte je nach aufgetragener Proteinmenge mittels Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987) oder Coomassie Brillant Blau Färbung (Sambrook *et al.*, 1989).

2.4.3 Western-Blot-Analyse

2.4.3.1 Immunologischer Nachweis von BetP-Varianten

Zum immunologischen Nachweis der Proteine mit Antikörpern wurde die Methode von Towbin *et al.* (1979) verwendet. Die Übertragung der Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran wurde mit dem *semi-dry*-Blotverfahren (Kyhse-Andersen, 1984) durchgeführt. Die Blockierung von freien Bindungsstellen auf der Membran erfolgte mit 3% (w/v) BSA in Waschpuffer (10 mM Tris/Cl pH 7,5, 0,9% NaCl). Der anschließende immunologische Nachweis von StrepBetP Varianten erfolgte mit Streptavidin-Alkalische-Phosphatase (AP)-Konjugat (1:5000; BioRad, München). 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 H₂O gestoppt.

2.4.3.2 Orientierung von StrepBetP in Proteoliposomen

Die Bestimmung der Orientierung von StrepBetP in Proteoliposomen erfolgte über die Zugänglichkeit der C-terminalen Extension von der Außen- oder Innenseite der Liposomen mit polyklonalen Antikörpern gegen das Gesamtprotein oder gegen die C-terminale Domäne. Epitope, die von der extraliposomalen Seite detektiert werden konnten, wurden folgendermaßen nachgewiesen: Vorgeformte Proteoliposomen wurden zu einer Proteinkonzentration von 50 ng BetP/ μ l in 10 mM TBS pH 7,5 verdünnt und für 90 Minuten mit einem der beiden Antikörpern oder entsprechenden Präimmunsereen (1:1000) bei 30°C inkubiert. Danach wurden die Proteoliposomen viermal mit 10 mM TBS pH 7,5 gewaschen und die BetP/Antikörper-Komplexe über SDS-PAGE (7,5%) elektrophoretisch getrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Antikörper wurden mit einem zweiten Antikörper

(Alkalische Phosphatase) mit CSPD als Substrat detektiert. Zur Immunodetektion von intraliposomal lokalisierten BetP-Bereichen wurden analog wie oben präparierte Proteoliposomen mit Antikörpern (1:100) gegen das Gesamtprotein oder gegen die C-terminale Extension inkubiert. Die Immunglobuline wurden durch zweimaliges Frieren/Tauen in die Proteoliposomen eingeschlossen. Danach wurden die Proteoliposomen durch eine 200 nm Polycarbonatmembran (Nucleopore[®], Whatman) extrudiert und einmal in Ig-freien Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 90 Minuten bei 30°C. Danach wurde der Zyklus aus zweimal Frieren/Tauen, Extrusion und Waschen zweimal wiederholt und die Menge an gebundenem Antikörper, wie oben beschrieben, detektiert. Zur Kontrolle wurde die gesamte Prozedur ebenfalls mit Protein-freien Liposomen durchgeführt.

Darüber hinaus wurde die Zugänglichkeit der N-terminalen Domäne von BetP durch ortsspezifische Proteolyse in solubilisiertem und rekonstituiertem BetP bestimmt. Beide Ansätze wurden in 10 mM TBS pH 8,0 bei einer Konzentration von 0,25 mg BetP/ml mit einer Aminopeptidase aus *Aeromonas proteolytica* und Aminopeptidase I aus *Streptomyces griseus* in einem BetP/Protease Verhältnis von 1:100 (w/w) bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde zu gegebenen Zeitpunkten durch Zugabe von Proteaseinhibitor Complete[®] gestoppt. Die Proteine wurden elektrophoretisch über SDS-PAGE analysiert. Die proteolytische Abspaltung an der N-terminalen Domäne wurde immunologisch, wie oben beschrieben, nachgewiesen.

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 *betP*-exprimierenden *E. coli* Zellen wurde LB-Medium (50 µg/ml Carbenicillin) mit einer ÜN-Kultur 1:30 angeimpft und bei 30°C und 135 Upm geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 1 wurde die Kultur mit 200 µg/l AHT (IBA, Göttingen) induziert und mindestens drei weitere Stunden geschüttelt. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden zentrifugiert und mit 100 mM KP_i-Puffer (pH 7,5) gewaschen. Die Zellen wurden in 100 KP_i pH 7,5, mit DNase (1:500) und Complete[®] nach Herstellerangaben resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit

einer „French Press“ (3 Durchgänge; SLM Aminco[®], Rochester, USA) bei einem Druck von 1,100 psi. Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurden die Membranen bei 300.000 g für 50 Minuten sedimentiert, mit dem oben aufgeführten Puffer gewaschen, anschließend in 1-2 ml Puffer pro Liter Zellkultur resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.5.2 Isolierung von Strep-BetP über StrepTactin[®]-Affinitätschromatographie

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

2.5.3 Präparation von Liposomen

Zur Herstellung von Liposomen wurde *E. coli polar total lipid extract* (Avanti Polar Lipids, Inc., USA), oder die synthetischen Phospholipide 1,2-Dioleoyl-sn-Glycerol-3-Phosphat (DOPG), 1,2-Dioleoyl-sn-Glycerol-3-Phosphoethanolamin (DOPE) und 1,2-Dioleoyl-sn-Glycerol-3-Phosphocholin (DOPC) verwendet. Alle Lipide waren in Chloroform suspendiert. Das Lösungsmittel wurde am Vakuumrotationsverdampfer abgezogen. Anschließend wurden die Lipide bis zur Trockne über Nacht lyophilisiert. Die Lipide wurden in 100 mM KP_i pH 7,5, 2 mM β -Mercaptoethanol unter starkem Rühren resuspendiert (20 mg Lipid/ml), aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.5.4 Rekonstitution von Strep-BetP in Liposomen

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

2.5.5 Variation der Lipidzusammensetzung der Liposomenmembran

Zur Variation der Lipidzusammensetzung durch Liposomenfusion wurden Proteoliposomen aus *E. coli* Phospholipiden mit Liposomen aus synthetischen Phospholipiden in den angegebenen Verhältnissen gemischt, extrudiert (200 nm Membran) und für ca. 1 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei RT langsam aufgetaut (ca. 45

Minuten). Die so präparierten Proteoliposomen konnten nach Extrusion zur Transportmessung eingesetzt werden.

2.5.6 Synthese von [¹⁴C]-Glycinbetain

Die Synthese von [¹⁴C]-Glycinbetain erfolgte nach der Methode von Landfald und Ström (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 mit Hilfe von 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 der *Speedvac* (Eppendorf, Hamburg) getrocknet und in 2 ml H₂O aufgenommen. Die Reinheit des [¹⁴C]-Glycinbetains wurde über Dünnschichtchromatographie (Laufmittel: Methanol/Wasser: 50/50; Kieselgel TLC Platten, Merk) nach der Methode von Blunden *et al.* (1981) kontrolliert. Nach sechsständiger Laufzeit erfolgte die Auswertung des Chromatogramms mit einem „Phosphoimager“

2.5.7 Radiochemische Transportmessungen

2.5.7.1 Messungen der Glycinbetain-Aufnahme in Proteoliposomen

Ein Aliquot Proteoliposomen wurde, wenn nicht anders angegeben, mit 100 mM KP_i pH 7,5 auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt, dreizehnmal extrudiert, mit dem gleichen Puffer auf ein Volumen von 3 ml aufgefüllt und zentrifugiert (353000 g, 20 min, 15°C). Aufgrund dieser Prozedur war es möglich, die interne Pufferzusammensetzung zu variieren, da der verwendete Puffer während des Extrudierens in die Proteoliposomen gelangt. Die Proteoliposomen wurden in einem geringem Volumen resuspendiert und zur Transportmessung eingesetzt. Zur Messung der Transportaktivität von BetP wurde, wenn nicht anders angegeben, ein externer Puffer mit 20 mM NaP_i pH 7,5, 25 mM NaCl verwendet. Die jeweilige Osmolalität wurde durch Zugabe von Sorbitol zum externen Puffer eingestellt. Zur Transportmessung wurden 500 µl externem Puffer 15 µM ¹⁴C-Glycinbetain und 1 µM Valinomycin zugesetzt. Zum Starten der Reaktion wurden 2,5 µl Proteoliposomen hinzugefügt. Jeweils 200 µl des

Ansatzes wurden nach 5 und 10 sec abgenommen und auf einen Zellulose-Mischester-Filter (0,22 μm Porengröße; Millipore, Eschborn) gegeben und mit Hilfe einer Mehrfachfiltrationsanlage (Hoefler, Pharmacia Biotech) gefiltert. Der Filter, auf dem die Proteoliposomen adsorbiert wurden, wurde unmittelbar nach Zugabe des Reaktionsansatzes mit 2,5 ml 100 mM LiCl gewaschen und mit 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint ecoplus, Roth, Karlsruhe) inkubiert. Die Radioaktivität wurde in einem β -Strahlen-Zählgerät (Beckman, München) bestimmt. Zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität des Reaktionsansatzes wurden 100 μl direkt mit Szintillationsflüssigkeit inkubiert und dessen Radioaktivität bestimmt. Alle im Ergebnisteil angegebenen Transportraten sind, wenn nicht anders angegeben, Durchschnittswerte aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

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

Zur Messung der BetP-Aktivität in *E. coli*-Zellen wurde LB-Medium (50 $\mu\text{g/ml}$ Carbenicillin) mit einer ÜN-Kultur in einem Verhältnis von 1:50 angeimpft, bei 37°C und 130 Upm bis zu einer OD_{600} von circa 0,5 geschüttelt, mit 200 μg AHT/Liter Zellkultur induziert und weitere 2 h geschüttelt. In der Regel wurden die Zellen mit 100 mM Tris/Mes (pH 7,5) gewaschen, bevor mit dem gleichen Puffer eine OD_{600} von circa 2 eingestellt wurde. Für die Transportmessung wurde 1 ml der Zellen circa 3 min bei 30°C in Puffer mit 10 mM Glukose und gewünschter Osmolalität inkubiert. Anschließend wurde die Substrataufnahme durch Zugabe von 250 μM [^{14}C]-Glycinbetain gestartet. Nach 15, 30, 45, 60 und 90 sec wurden jeweils 200 μl der Zellsuspension auf Glasfaserfilter (Typ F, Millipore, Eschborn) über eine Mehrfachfiltrationsanlage abfiltriert. Unmittelbar nach der Filtration wurden die Filter mit 2 x 2,5 ml Waschlösung (500 mM Saccharose, 50 mM MgCl_2 , nach Perroud und Le Rudelier, 1985) gewaschen und die Proben mit 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Die auf dem Filter verbleibende Radioaktivität wurde in einem β -Strahlen-Zählgerät bestimmt. Die Berechnung der Substrataufnahmerate erfolgte auf der Grundlage, dass eine OD_{600} von 1 einem Zellrockengewicht von 0,34 mg/ml entspricht.

2.5.7.3 Messungen der Glycinbetain-Aufnahme in *C. glutamicum* DHPF

Die *C. glutamicum* Zellen wurden über Nacht in BHI-Medium mit 250 μM IPTG zur Induktion angezogen, abzentrifugiert und zweimal mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5; 4°C) gewaschen und im gleichen Puffer resuspendiert, wobei eine OD_{600} von 2 eingestellt wurde. Die Messungen erfolgten analog zu 2.5.7.2, außer, dass als externer Puffer stets 50 mM KP_i pH 7,5 verwendet 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]-Glycinbetain. Über einen Zeitraum von 1,5 min wurden in regelmäßigen Abständen Proben von je 200 µl entnommen und mit Hilfe einer Mehrfachfiltrationsanlage auf Glasfaserfilter (Typ F, Millipore, Eschborn) abfiltriert, wobei die Filter unmittelbar nach der Filtration mit 5 ml Waschlösung (100 mM LiCl) gewaschen wurden. Die Filter wurden mit 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und mit Hilfe eines Szintillationszählers (LS 6500, Beckmann Coulter Inc., Unterschleissheim-Lohhof) ausgewertet. Durch die lineare Auftragung der gemessenen Radioaktivität gegen die Zeit konnte mit Hilfe der erhaltenen Steigung die Transportgeschwindigkeit berechnet werden.

3. Ergebnisse

Unter hyperosmotischem Stress entgeht *Corynebacterium glutamicum* einem drohenden Wasserverlust des Cytoplasmas durch Akkumulation von kompatiblen Soluten, deren Aufnahme durch die vier sekundären Transportsysteme BetP, EctP, ProP and LcoP vermittelt werden kann. BetP ist ein hochaffiner Na⁺/Betain Symporter und wird auf Aktivitäts- und Expressionsebene in Abhängigkeit der externen Osmolalität reguliert. Im rekonstituierten System behält BetP seine nativen Eigenschaften wie hohe Affinität zu seinem Substrat und schnelle Aktivierbarkeit bei und besitzt osmosensorische und osmoregulatorische Eigenschaften, d.h., der Carrier ist in der Lage, osmotische Bedingungen ohne zusätzliche Faktoren wahrzunehmen und seine Aktivität in Abhängigkeit der externen Osmolalität zu regulieren. Als osmotischer Stimulus, der zur Aktivierung von BetP führt, konnte im Proteoliposomensystem eine Erhöhung der intraliposomalen Kaliumionenkonzentration identifiziert werden (Rübenhagen *et al.*, 2001). Untersuchungen an N- und C-terminal verkürzten BetP-Varianten in *C. glutamicum* belegten, dass die sensorische von der katalytischen Funktion des Transporters getrennt werden kann. So führte die Verkürzung der C-terminalen Domäne um 25 Aminosäuren zum Verlust der osmotisch regulierten Aktivität des Carriers (Peter *et al.*, 1998b). In dieser Arbeit wurde eine mögliche direkte Beteiligung der C-terminalen Domäne an der Wahrnehmung osmotisch induzierter K⁺-Konzentrationsänderungen untersucht. Hierzu wurden in ihrer C-terminalen Extension modifizierte BetP-Varianten funktionell in Liposomen rekonstituiert und hinsichtlich ihrer osmotischen und Ionen-spezifischen Aktivitätsregulation untersucht. Die *in vitro* gewonnenen Daten konnten durch *in vivo*-Studien in *E. coli*- und *C. glutamicum*-Zellen bezüglich ihrer physiologischen Relevanz bewertet werden.

3.1 Charakterisierung der Cystein-freien BetP-Variante C252T

Die in dieser Arbeit untersuchten BetP-Varianten basieren auf der Cystein-freien BetP Variante BetP C252T (Rübenhagen *et al.*, 2001). Diese Mutante wurde konstruiert, um in zukünftigen Experimenten die Proteindynamik mit Hilfe eingeführter Cysteine fluoreszenzspektroskopisch zu untersuchen. Zunächst wurde geklärt, ob der Austausch des einzigen Cysteins gegen Threonin an Position 252 in der fünften Transmembranhelix Auswirkungen auf die Aktivitätsregulation des Carriers im Vergleich zum Wildtypprotein hatte. Hierzu wurden zum einen die osmoregulatorischen Eigenschaften von BetP C252T in Zellen von *E. coli*, zum anderen die osmoregulatorischen und chemosensorischen

Eigenschaften des Cystein-freien Proteins in Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden mit denen des Wildtypproteins verglichen.

3.1.1 Osmoregulation von BetP und BetP C252T im Stamm *E. coli* MKH13

Zunächst wurde die Transportaktivität der Cystein-freien Form von BetP unter physiologischen Bedingungen in *E. coli* untersucht. Hierzu wurde der Stamm MKH13, in dem die Gene der Transportsysteme für kompatible Solute deletiert sind ($\Delta putPA$, $\Delta proP$ und $\Delta proU$), gewählt (Haardt *et al.*, 1995). Die Aufnahme von kompatiblen Soluten unter hyperosmotischen Bedingungen erfolgte in diesen Zellen daher ausschließlich durch Plasmid-kodierte osmotisch regulierte Transportsysteme. Die Betainaufnahmeaktivität der Stämme MKH13/pBetP und MKH13/pBetP C252T ist in Abbildung 3 dargestellt. Beide Proteine zeigten eine vergleichbare Regulation der Carrieraktivität, d.h., dass sich in Abhängigkeit der externen Osmolalität die Aufnahmeraten des Wildtypproteins und der Cystein-freien Version erhöhten. Die maximalen Transportaktivitäten konnten mit 79 bzw. 86 nmol/(min*mg TG) bei einer externen Osmolalität von 0,6 osmol/kg beobachtet werden. Zwar erreichte BetP C252T eine etwas höhere absolute Transportrate im Vergleich zum Wildtyp, hinsichtlich des osmotisch induzierten Aktivierungsprofils jedoch ist die Cystein-freie Mutante in ihren osmoregulatorischen Eigenschaften nahezu identisch zum Wildtyp.

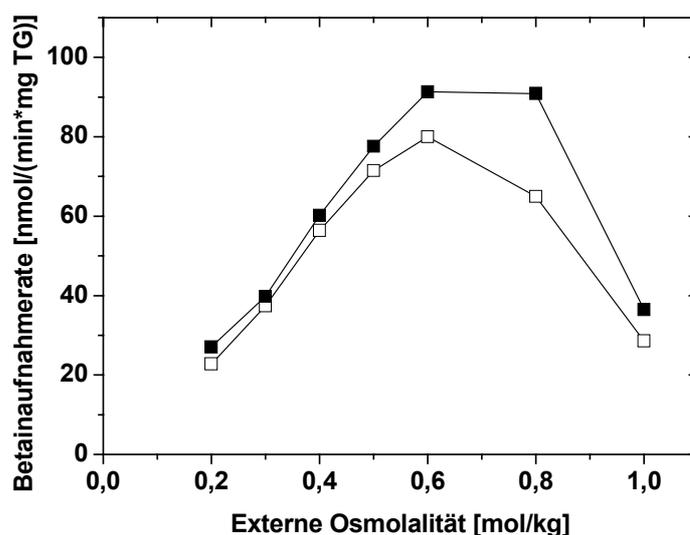


Abb. 3: Transportaktivität von BetP und BetP C252T in Abhängigkeit von der externen Osmolalität in *E. coli* MKH13. Die Osmolalität des externen Puffers (100 mM Tris/Mes pH 7,5, 50 mM NaCl) wurde durch Sorbitol erhöht. Die Aufnahmemessung wurde durch Zugabe von 250 μ M 14 C-Glycinbetain gestartet. Die Aufnahmeaktivitäten von MKH13/pBetP (offene Symbole) und MKH13/pBetP C252T (geschlossene Symbole) sind gezeigt.

3.1.2 Osmoregulation und chemosensorische Eigenschaften von BetP und BetP C252T in Proteoliposomen aus *E. coli* Lipiden

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Cystein-freie Variante BetP C252T *in vivo* ein der Wildtypform vergleichbares osmotisches Aktivierungsprofil aufwies (vergl. 3.1.1), wurden im folgenden die osmoregulatorischen und chemosensorischen Eigenschaften von BetP C252T im Proteoliposomensystem überprüft. Im Gegensatz zu physiologischen Aktivitätsstudien können in diesem *in vitro*-System durch Variation des intraliposomalen Puffers zusätzlich die Ionen-spezifische Carrier-Aktivierung von BetP-Varianten untersucht werden.

Die katalytische Aktivität von BetP C252T ist im rekonstituierten System osmotisch reguliert. (Abb. 4A). Die spezifische maximale Aufnahmerate ist, wie bereits in *E. coli*-Zellen beobachtet, in Proteoliposomen mit 1198 nmol/(min*mg Protein) höher als beim Wildtypprotein (874 nmol/(min*mg Protein)), allerdings ist das osmotische Aktivierungsprofil von BetP C252T nahezu identisch zum Wildtyp. Zur Aufnahmemessung wurden in diesem Experiment (Abb. 4A) Proteoliposomen in einem hypertonen Puffer verdünnt. Hierdurch ändert sich schlagartig die interne und externe Osmolalität, die Membranspannung, sowie das Volumen der Proteoliposomen durch den osmotisch bedingten Wasserausstrom. Da sich Liposomen und Proteoliposomen in dem hier untersuchten Osmolalitätsbereich wie ideale Osmometer verhalten, erhöht sich die interne Konzentration an Teilchen linear zum osmotischen Gradienten über der Liposomenmembran (White *et al.*, 2000; Racher *et al.*, 2001).

Ob für die beobachtete osmotische Aktivierung von BetP C252T ebenfalls die, wie für BetP beschriebene Wahrnehmung der osmotisch induzierten Erhöhung der intraliposomalen K⁺-Konzentration verantwortlich ist (Rübenhagen *et al.*, 2001), wurde im folgenden Experiment geklärt (Abb. 4B). Hierbei wurden unter isoosmotischen Bedingungen die Betainaufnahmeraten bei unterschiedlichen internen K⁺-Konzentrationen bestimmt. Im Gegensatz zum vorherigen Experiment (Abb. 4A) ändern sich in diesem Versuch keiner der angesprochenen Parameter. Die Transportaktivität war allein von der internen Kaliumionenkonzentration abhängig. Wie in der Abbildung 4B ersichtlich, erhöhte sich die Transportaktivität von BetP C252T in Abhängigkeit von der intraliposomalen K⁺-Konzentration von 237 auf 935 nmol/(min*mg Protein). Somit wird, wie bereits für den Wildtyp beschrieben, die katalytische Aktivität von BetP C252T im rekonstituierten System durch interne Kaliumionen stimuliert. Die zum Wildtypprotein vergleichbare Aktivitätsregulation in Zellen und in Proteoliposomen, sowie die nahezu identische K⁺-

abhängige Proteinaktivität in Proteoliposomen zeigte, dass BetP C252T für die in dieser Arbeit zu untersuchenden Fragestellungen verwendet werden konnte.

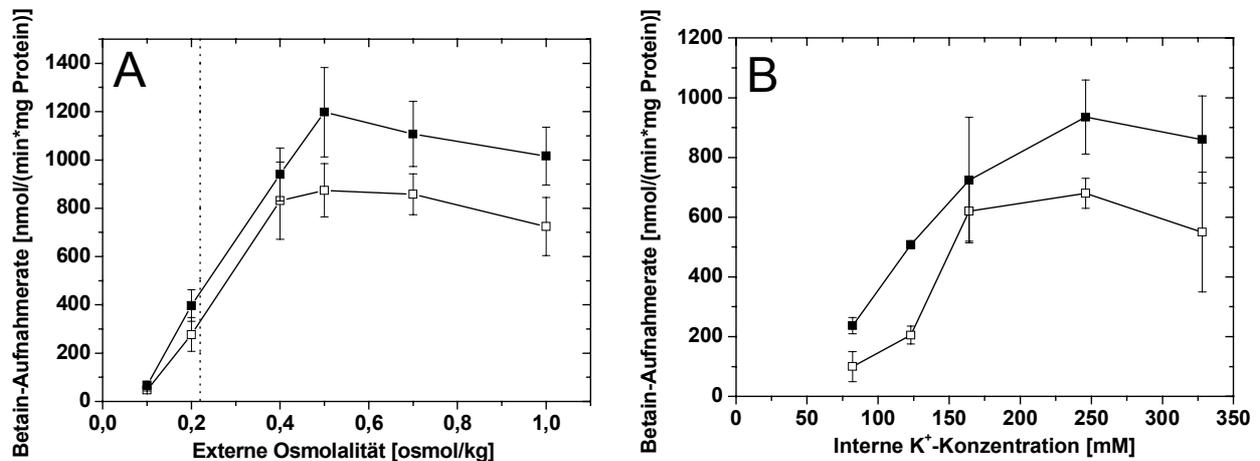


Abb. 4: Aktivitätsregulation der BetP und BetP C252T in Abhängigkeit der externen Osmolalität und der intraliposomalen K⁺-Konzentration. (A) Die Betainaufnahme in Proteoliposomen wurde unter hyperosmotischen Bedingungen bestimmt. Der interne Puffer enthielt 100 mM KP_i, pH 7,5 und hatte eine Osmolalität von 0,22 osmol/kg. Der externe Puffer enthielt 20 mM NaP_i, pH 7,5, 25 mM NaCl und hatte eine Osmolalität von 0,1 osmol/kg. Höhere externe Osmolalitäten wurden durch Zugabe von Sorbitol eingestellt. Die Volumenreduktion der Proteoliposomen erfolgte linear zum osmotischen Gradienten über der Liposomenmembran. Die gestrichelte Linie repräsentiert Isoosmolalität zwischen internem und externem Puffer. (B) Betainaufnahme in Abhängigkeit der K⁺-Konzentration. Der interne Puffer enthielt 45,6, 68,4, 91,2, 136,8, und 182,4 mM KP_i, pH 7,5. Dies entsprach internen K⁺-Konzentrationen von 82, 123, 164, 246 und 328 mM. Der externe Puffer enthielt 20 mM NaP_i, pH 7,5, 25 mM NaCl (100 mosmol/kg). Isoosmolalität zwischen internem und externem Puffer wurde durch Zugabe von Sorbitol zum externen Puffer eingestellt. Gezeigt ist die Aufnahmeaktivität des von BetP (offene Symbole) und seiner Cystein-freien Variante BetP C252T (geschlossene Symbole).

3.1.3 Die katalytische Aktivierung von BetP C252T ist spezifisch für Kaliumionen

In früheren Studien zur Reizwahrnehmung von BetP in Proteoliposomen konnte gezeigt werden, dass die Transportaktivität ausschließlich durch eine Erhöhung der intraliposomalen K⁺-Konzentration (oder Cs⁺ und Rb⁺) ausgelöst wird. NH₄⁺ oder Cholin⁺ waren nicht in der Lage, BetP zu aktivieren (Rübenhagen *et al.*, 2001). Die Frage, ob Natriumionen ebenfalls zur Aktivierung des Carriers beitragen, konnte bisher aus folgendem Grund nicht geklärt werden: Der Transport von Betain erfolgt im Symport mit zwei Natriumionen. Die treibende Kraft dieses Symports ist das elektrochemische Natriumpotenzial ($\Delta\mu_{\text{Na}^+}$). Dieses setzt sich in

Proteoliposomen nach (4) aus dem chemischen Na^+ -Potenzial ($\Delta\mu_{\text{Na}^+}$), d.h., einem Na^+ -Gradienten über der Liposomenmembran und aus einem K^+ -Gradienten, der in Anwesenheit von Valinomycin zu einem nach außen gerichteten K^+ -Diffusionspotenzial ($\Delta\Psi$) führt, zusammen:

$$\Delta\mu_{\text{Na}^+} = \Delta\Psi - 59 \log \frac{[\text{Na}^+_{\text{ex}}]}{[\text{Na}^+_{\text{in}}]} \quad (4)$$

wobei $\Delta\Psi = -2,3 \cdot \text{RT}/\text{F} \cdot \log [\text{K}^+_{\text{in}}]/[\text{K}^+_{\text{ex}}]$, $2,3 \cdot \text{RT}/\text{F} = 59 \text{ mV}$, mit $\text{R} =$ allgemeine Gaskonstante, $\text{T} =$ absolute Temperatur in Kelvin und $\text{F} =$ Faraday-Konstante. $[\text{Na}^+_{\text{in}}]$ und $[\text{Na}^+_{\text{ex}}]$ bzw. $[\text{K}^+_{\text{in}}]$ und $[\text{K}^+_{\text{ex}}]$ sind die intra- und extraliposomalen Na^+ - und K^+ -Konzentrationen.

Da die Untersuchungen zur möglichen BetP-Aktivierung durch Na^+ in einem erheblichen Maße vom apparenten K_m für Na^+ der Mutante BetP C252T abhingen, wurde dieser in einer Serie von 7 Experimenten in Liposomen aus 3 unterschiedlichen Chargen an *E. coli*-Lipidextrakten bestimmt. Diese Kontrolle war notwendig, da der apparente K_m für Na^+ mit dem Anteil an negativ geladenen Phospholipiden der einzelnen Lipidextrakte variieren kann. Es wurde ein durchschnittlicher apparenter K_m für Na^+ von $43,9 \pm 1,9 \text{ mM}$ ermittelt. Wie beim sekundären Carrier für kompatible Solute ProP aus *E. coli* beobachtet worden ist, kann sich die Substrataffinität eines osmotisch regulierten Transportproteins in Abhängigkeit der externen Osmolalität ändern (Racher *et al.*, 2001). Bei der Bestimmung der apparenten Na^+ -Affinität von BetP unter verschiedenen Osmolalitäten, konnte allerdings keine signifikante Änderung der Cosubstrataffinität festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Zur Untersuchung einer putativen Stimulierung der BetP-Aktivität durch Natriumionen müsste die interne Na^+ -Konzentration variiert werden. Änderungen interner Na^+ -Konzentrationen beeinflussen jedoch den Wert des elektrochemischen Na^+ -Potenzials als treibende Kraft des Betainimports. Dennoch konnte in dieser Arbeit eine Rolle von Natriumionen als putativer Stimulus der BetP-Aktivierung untersucht werden. Hierzu wurde die Transportaktivität von BetP C252T bei einem konstanten elektrochemischen Na^+ -Potenzial unter variierenden K^+ - und Na^+ -Konzentrationen bestimmt (Abb. 5). In einem ersten Experiment wurden die internen Natriumionenkonzentrationen zwischen 1-15 mM variiert, während die externe Na^+ -Konzentration mit 10-150 mM jeweils zehnfach höher eingestellt wurde. Diese Proteoliposomen wurden zur Transportmessung in der Weise in einem hypertonen Puffer verdünnt, dass eine Volumenreduktion der Vesikel um den Faktor 2,7

resultierte. Folglich bildete sich ein Na^+ -Gradient von 3,7 (ex/in) mit $\Delta p\text{Na}^+ = 0,57$ über der Proteoliposomenmembran. Die internen K^+ -Konzentrationen wurden durch die Verwendung von 19, 50 oder 100 mM KP_i -Puffer variiert. Durch gleichartige Verdünnung (jeweils 200fach) der Proteoliposomen, die in den jeweiligen KP_i -Puffern resuspendiert waren, in einen K^+ -freien externen Puffer, ist der K^+ -Gradient über der proteoliposomalen Membran mit K^+ in/ex = 200 immer gleich. Das Ausmaß der Erhöhung der internen K^+ -Konzentration ist in allen Experimenten identisch (Faktor 2,7). Somit war das K^+ -Diffusionspotenzial mit $\Delta\Psi = -161$ mV in allen Ansätzen konstant.

Wie in der Abbildung 5A ersichtlich, erhöhte sich die BetP-Aktivität mit zunehmenden Na^+ und K^+ -Konzentrationen. Um in diesen Experimenten eine putative Stimulation der BetP-Aktivität durch Erhöhung der internen Natriumionenkonzentration von einer Erhöhung der Transportgeschwindigkeit durch zunehmende Sättigung der externen Na^+ -Bindestellen des Carriers zu unterscheiden, wurden die jeweiligen Aufnahmeraten mit Hilfe des K_m von 43,9 mM für Na^+ auf maximale Transportgeschwindigkeit extrapoliert (Abb. 5B). Da die Transportgeschwindigkeit der Betainaufnahme durch BetP einer Michaelis-Menten Kinetik entspricht (Farwick *et al.*, 1995), konnte V_{max} nach folgender Formel (5) berechnet werden:

$$V_{max} = v * \left(\frac{K_m}{[\text{Na}_{ex}^+]} + 1 \right) \quad (5)$$

Nach Extrapolation der Betainaufnahmeraten aus Abbildung 5A auf V_{max} konnte eine Na^+ -Stimulierung der BetP-Aktivität um die Faktoren, 1,2 (100 mM KP_i), 1,5 (50 mM KP_i) und 1,9 (19 mM KP_i) beobachtet werden. Diese BetP-Aktivierung durch Na^+ wurde durch die zunehmende Stimulation der Betainaufnahme durch internes Kalium allmählich überdeckt, d.h., mit Erhöhung der internen K^+ -Konzentration sinkt die durch Na^+ beobachtbare Stimulierung der BetP-Aktivität.

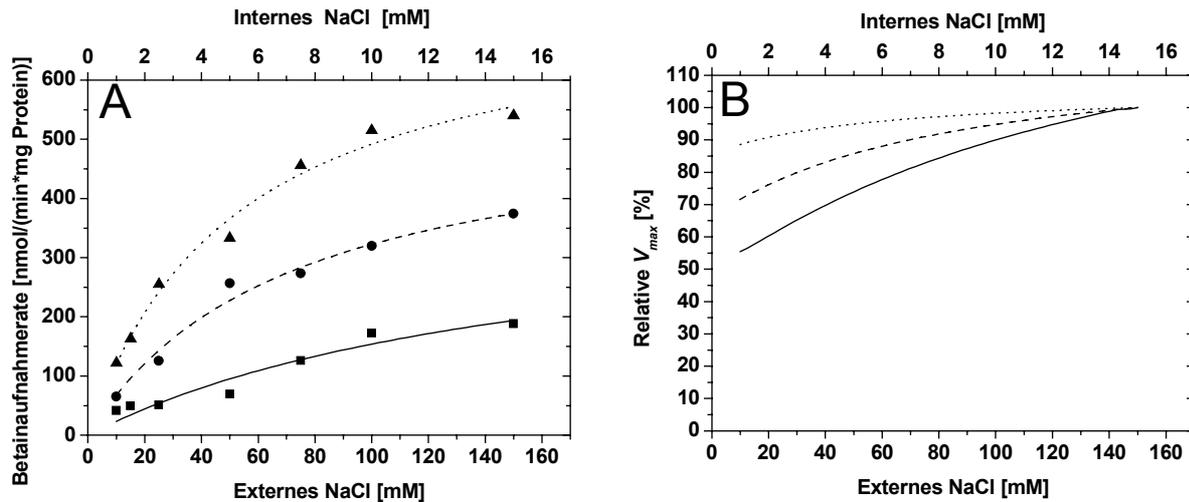


Abb. 5. Stimulation der BetP-Aktivität durch intraliposomale Na^+ und K^+ . (A) BetP-Aktivität unter verschiedenen NaCl-Konzentrationen in Proteoliposomen mit unterschiedlichen KP_i -Puffern. Die internen NaCl-Konzentrationen variierten zwischen 1-15 mM und waren zehnmal geringer als im externen Medium. Proteoliposomen wurden mit internen Puffern von 19 (Quadrate), 50 (Kreise) oder 100 mM (Dreiecke) KP_i pH 7,5 präpariert. Für die Betainaufnahmemessungen wurden die Proteoliposomen in einem hypertonen Medium mit einer 2,7fach höheren Osmolalität als der intraliposomale Puffer verdünnt. Folglich wurde das liposomale Volumen um den Faktor 2,7 verringert und die Konzentration interner Solute um den gleichen Faktor erhöht. (B). Berechnete V_{max} der Betainaufnahme (aus A) auf Grund des apparenten K_m für Na^+ von 43,9 mM. Die absoluten Aufnahmeraten der berechneten V_{max} unter den drei untersuchten Bedingungen (Ausgangskonzentrationen an KP_i von 19, 50 oder 100 mM) (durchgezogene, gestrichelte und gepunktete Linie) wären 241, 490 and 719 nmol/(min*mg Protein).

Die Stimulation der Betainaufnahme durch Na^+ wurde in einem weiterführenden Experiment direkt mit der K^+ -abhängigen Aktivierung verglichen (Abb. 6). Hierzu wurden die Transportraten unter einem konstanten chemischen Natriumpotenzial ($\Delta\mu_{\text{Na}^+} = 0$) und einem konstanten Kaliumdiffusionspotenzial von $\Delta\Psi = -136$ mV bestimmt. Die intraliposomale K^+ -Konzentration war mit 34 mM so gewählt, dass keine Stimulierung der BetP-Aktivität durch Kaliumionen erfolgte. Darüber hinaus wurde unter isoosmotischen Bedingungen gemessen, so dass eine Transportaktivität nur auf Änderungen der internen Na^+ -Konzentration zurückgeführt werden konnte. Durch Extrapolation der Betainaufnahmeraten auf maximale Transporteraktivität unter sättigenden Na^+ -Konzentrationen konnte nur eine geringfügige Stimulation des Betainimports beobachtet werden (Abb. 6A).

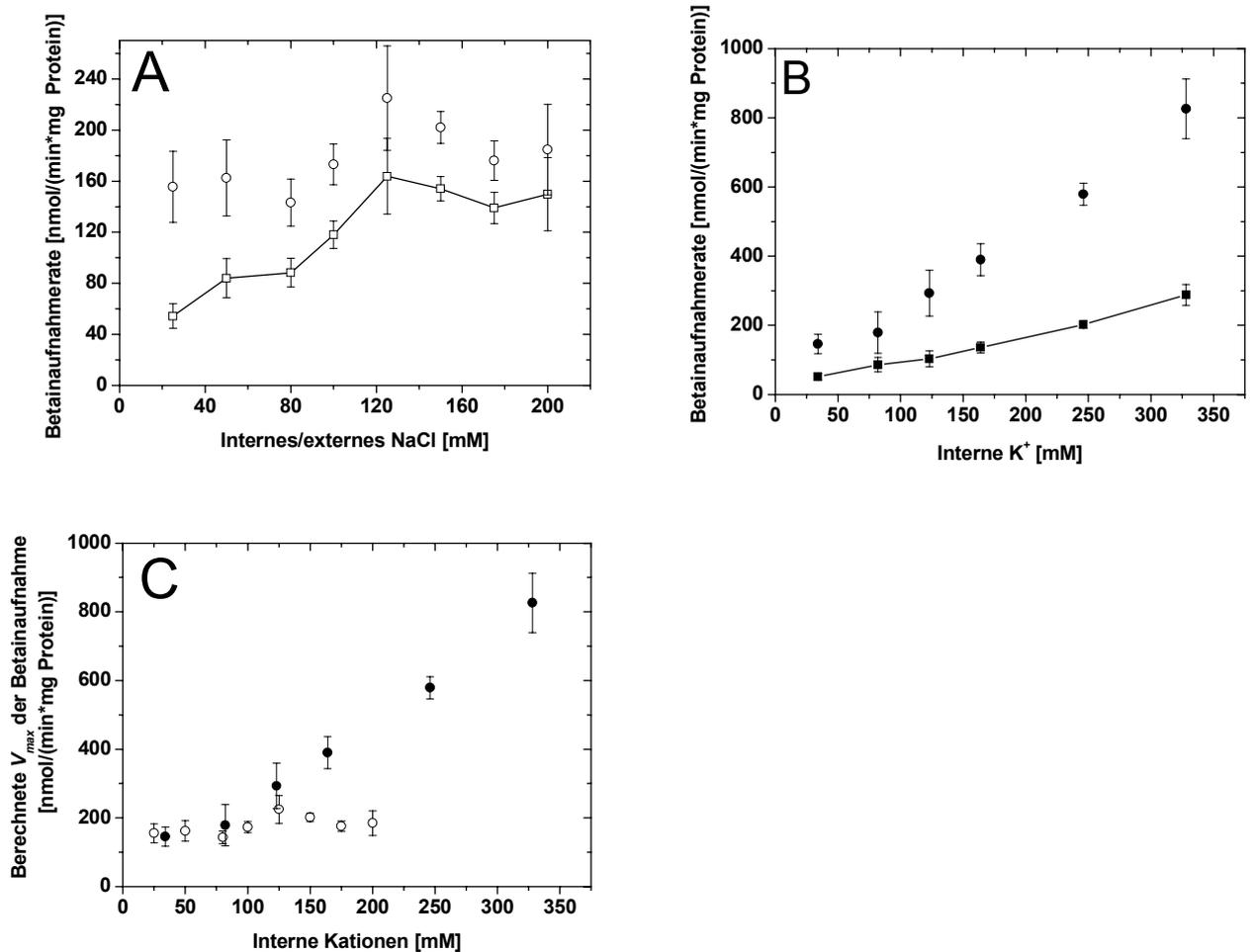


Abb. 6. Aktivitätsregulation von BetP C252T bei variierenden intraliposomalen Na^+ - und K^+ -Konzentrationen. Die Betainenaufnahme wurde unter isoosmotischen Bedingungen bei geringen internen K^+ -Konzentrationen und in Abwesenheit eines chemischen Na^+ -Gradienten bestimmt. **(A)** Einfluss der equimolaren Erhöhung der internen und externen Na^+ -Konzentration auf die Betainenaufnahme. Der interne Puffer enthielt 19 mM KP_i , pH 7,5 und jeweils 25, 50, 80, 100, 125, 150, 175 oder 200 mM NaCl. Der externe Puffer enthielt 50 mM Tris/Mes, pH 7,5 und jeweils 25, 50, 80, 100, 125, 150, 175 oder 200 mM NaCl. Die absoluten Aufnahmeraten (offene Quadrate) wurden mit Hilfe des apparenten K_m für Na^+ von 43,9 mM auf V_{max} extrapoliert (offene Kreise). **(B)** Einfluss sukzessiver Erhöhungen der internen K^+ -Konzentrationen auf die Betainenaufnahme. Der interne Puffer der Proteoliposomen enthielt 25 mM NaCl und jeweils 19, 45,6, 68,4, 91,2, 136,8 oder 182,4 mM KP_i , pH 7,5. Dies entsprach internen K^+ -Konzentrationen von 34, 82, 123, 164, 246, und 328 mM. Der externe Puffer enthielt 50 mM Tris/Mes, pH 7,5, 25 mM NaCl (100 mosmol/kg). Isoosmolalität zwischen internem und externen Puffer wurde durch Zugabe von Sorbitol zum externen Puffer eingestellt. Die absoluten Aufnahmeraten (geschlossene Quadrate) wurden mit Hilfe des apparenten K_m für Na^+ von 43,9 mM auf V_{max} extrapoliert (geschlossene Kreise). **(C)** Vergleich der Na^+ -stimulierten (offene Kreise aus A) und der K^+ -stimulierten (geschlossene Kreise aus B) BetP-Aktivität unter sättigender Na^+ -Konzentration.

Im Vergleich hierzu wurde in einem methodisch identischen Experiment, d.h., unter identischen internen und externen Na^+ -Konzentrationen von 25 mM und einem konstanten Membranpotenzial, aber durch Variation der internen K^+ -Konzentration eine mehr als 5,5-fache K^+ -abhängige BetP-Aktivierung bestimmt (Abb. 6B).

In Abbildung 6C sind zur Gegenüberstellung die Werte für V_{max} aus Abb. 6A und 6B der Na^+ - bzw. der K^+ -Stimulation gegen die internen Kationenkonzentrationen aufgetragen. Vergleicht man das Ausmaß der Aktivierung bei sukzessiver liposomaler Na^+ - bzw. K^+ -Erhöhung, so ergibt sich eine geringfügige BetP-Aktivierung bis zu internen Na^+ -Konzentrationen von 120 mM gegenüber einer starken Stimulation durch K^+ , die bei einer internen Kaliumionenkonzentration von 328 mM noch nicht maximal war. Darüber hinaus ist eine Stimulation durch Na^+ nur bei intraliposomalen K^+ -Konzentrationen zu beobachten, die unterhalb des Schwellenwertes der K^+ -abhängigen BetP-Aktivierung liegen (<100 mM K^+ intern).

3.2 Charakterisierung C-terminal verkürzter BetP-Varianten

Verkürzungen der C-terminalen Domäne von BetP um 12 oder 25 Aminosäuren führten zum Verlust der osmoregulatorischen Eigenschaft des Proteins in *C. glutamicum*-Zellen. Diese BetP Varianten waren unabhängig von der externen Osmolalität permanent aktiv (Peter *et al.*, 1998b). Da durch *in vivo* Studien der Stimulus zur BetP-Aktivierung nicht untersucht werden kann, war es notwendig, die C-terminal verkürzten BetP-Varianten zu reinigen und in Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden zu rekonstituieren. Bevor Studien zu osmoregulatorischen und chemosensorischen Eigenschaften der C-terminal verkürzten BetP-Varianten im rekonstituierten System unternommen wurden, wurde zunächst deren osmotisches Aktivierungsprofil unter physiologischen Bedingungen in *E. coli* bestimmt.

3.2.1 Osmoregulation von BetP C252T, BetP C Δ 12, BetP C Δ 25 und BetP C Δ 45 in *E. coli* MKH13

Zur Untersuchung der Osmoregulation C-terminal verkürzter BetP-Varianten *in vivo* wurde der Stamm MKH13, in dem alle Transportsysteme für compatible Solute deletiert sind, mit Vektoren, die jeweils die Gene für BetP C252T, BetP Δ 12, BetP Δ 25 und BetP Δ 45 trugen, transformiert und die Betainaufnahmeraten unter zunehmenden externen Osmolalitäten bestimmt. Zur Kontrolle wurden ebenfalls Zellen, die den Vektor pASK-IBA5 ohne Insert

trugen, getestet. In diesem Experiment konnte überprüft werden, ob der für die Proteinreinigung notwendige N-terminale StrepTagII die Proteinaktivität bzw. den Einbau der rekombinanten und verkürzten Carrier in die Zellmembran beeinflusst. Weiterhin konnte für die BetP-Derivate BetP C252T, BetP C Δ 12 und BetP C Δ 25 das osmotisch induzierte Aktivierungsprofil in *E. coli* mit dem aus *C. glutamicum* bekannten Profil (Peter *et al.*, 1998b) verglichen werden. In Abbildung 7 ist die Transportaktivität C-terminal verkürzter BetP-Varianten in Abhängigkeit der externen Osmolalität in *E. coli* Zellen gezeigt. BetP C252T und BetP C Δ 12 zeigten eine osmotisch regulierte Betainaufnahme mit Aktivitätsmaxima bei einer externen Osmolalität von 0,6 osmol/kg. Die Mutanten BetP C Δ 25 und BetP C Δ 45 hingegen zeigten ein osmotisch dereguliertes Betainaufnahmeverhalten, da bereits bei niedrigen externen Osmolalitäten maximale Transportraten bestimmt werden konnten. In Zellen ohne Plasmid-kodierte BetP-Variante war keine Aufnahmeaktivität zu beobachten. Das Regulationsverhalten der BetP-Varianten BetP C Δ 12 und BetP C Δ 25 war in *C. glutamicum* und in *E. coli* vergleichbar. Allerdings war das Optimum der Aktivierung in *E. coli*-Zellen zu niedrigeren externen Osmolalitäten hin verschoben (vergl. 3.4.3).

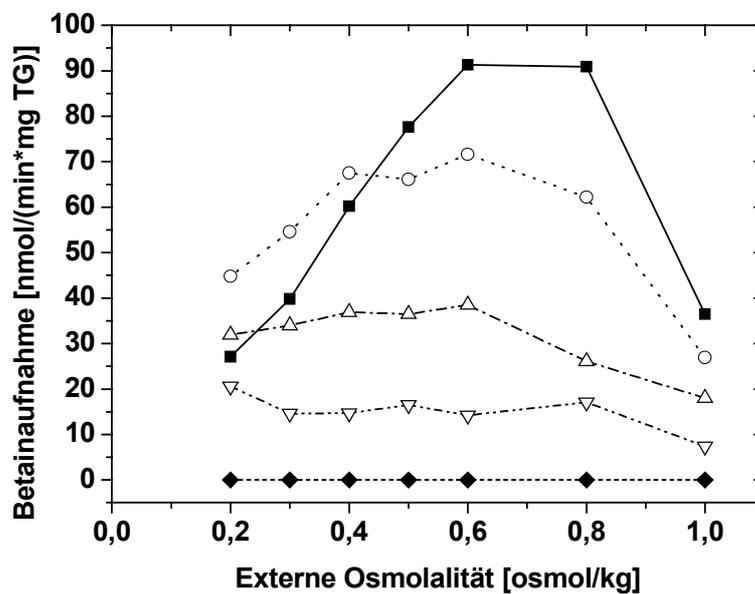


Abb. 7: Transportaktivität von BetP C252T und C-terminal verkürzter BetP-Varianten in Abhängigkeit der externen Osmolalität in *E. coli* MKH13. Externer Puffer: 100 mM Tris/Mes pH 7,5, 50 mM NaCl. Die Osmolalität des externen Puffers wurde durch Sorbitol erhöht. Die Aufnahmemessung wurde durch Zugabe von 250 μ M 14 C-Glycinbetain gestartet. Die Aufnahmeaktivitäten folgender Stämme ist gezeigt: MKH13/pBetP C252T (Quadrate), MKH13/pBetP C Δ 12 (Kreise), MKH13/pBetP C Δ 25 (offene Dreiecke), MKH13/pBetP C Δ 45 (umgekehrte Dreiecke) und MKH13/pASK-IBA5 (Diamanten).

3.2.2 Osmoregulation von BetP C252T und den C-terminal verkürzten Varianten BetP CΔ12, BetP CΔ25 und BetP CΔ45 in Proteoliposomen

Die Untersuchung der C-terminalen Deletionsmutanten im rekonstituierten System sollte Aufschluss darüber geben, ob die Aktivität dieser BetP-Varianten *in vitro* osmotisch reguliert ist oder nicht. Hierzu wurden die gereinigten Transporter BetP CΔ12, BetP CΔ25 und BetP CΔ45 in *E. coli*-Liposomen rekonstituiert und die Proteinaktivitäten in Abhängigkeit der extraliposomalen Osmolalität bestimmt. Auf Grund der unterschiedlichen Affinitäten zu Na⁺ (vergl. 3.2.4) wurden die externen Konzentrationen des Cosubstrats mit 61 mM (BetP C252T, BetP CΔ12 und BetP CΔ25) bzw. 116 mM (BetP CΔ45) konstant gehalten.

Alle untersuchten Mutanten waren nach Rekonstitution in Liposomen aus *E. coli*-Lipiden funktionell aktiv, d.h., der N-terminale StreptagII hatte keinen Einfluss auf die Transportaktivität (Abb. 8). Die Deletion von 25 oder 45 C-terminalen Aminosäuren führte zu

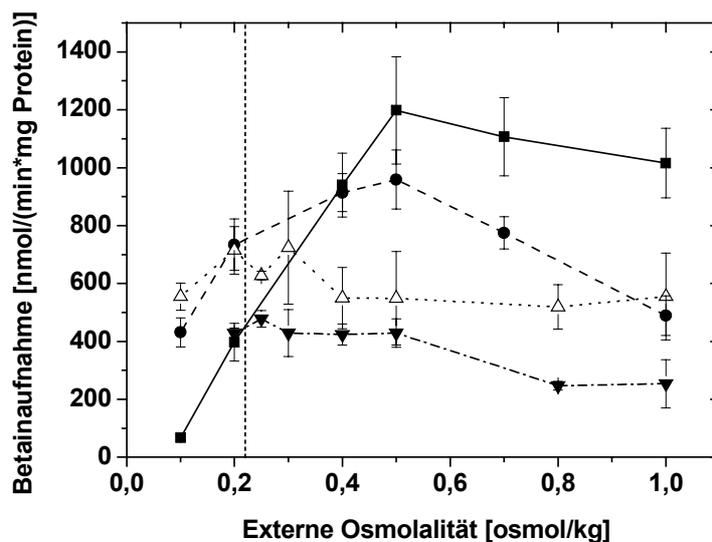


Abb. 8: Aktivitätsregulation von BetP C252T und den C-terminal verkürzten Varianten BetP CΔ12, BetP CΔ25 und BetP CΔ45 in Proteoliposomen in Abhängigkeit der externen Osmolalität. Die Betainaufnahme in Proteoliposomen wurde unter hyperosmotischen Bedingungen bestimmt. Der interne Puffer enthielt 100 mM KP_i, pH 7,5 und hatte eine Osmolalität von 0,22 osmol/kg. Der externe Puffer enthielt 20 mM NaP_i, pH 7,5, 25 mM NaCl (für BetP CΔ45 wurde auf Grund der geringen Na⁺-Affinität die Konzentration von NaCl auf 80 mM erhöht) und hatte eine Osmolalität von 0,1 osmol/kg. Höhere externe Osmolalitäten wurden durch Zugabe von Sorbitol eingestellt. Gezeigt ist die Aufnahme von Betain durch BetP C252T (Quadrate), BetP CΔ12 (Kreise), BetP CΔ25 (offene Dreiecke) und BetP CΔ45 (umgekehrte Dreiecke). Die gestrichelte Linie repräsentiert Isoosmolalität zwischen internem und externem Puffer.

BetP-Varianten, die, unabhängig von der externen Osmolalität, mit Aufnahmeraten von durchschnittlich ca. 600 bzw. 400 nmol/(min*mg Protein) permanent aktiv waren. Diese Mutanten hatten somit die dem Wildtypprotein und der Cystein-freien Variante immanente osmotische Regulierbarkeit verloren (vergl. Abb. 4). Die Verkürzung der C-terminalen Domäne um 12 Aminosäuren hingegen führte zu einem Carrier, dessen Transportrate unter hypoosmotischen Bedingungen bereits 45% der maximalen Proteinaktivität betrug, dessen Aktivität allerdings trotzdem noch osmotisch reguliert war. Die katalytische Aktivitäten von BetP C Δ 12 und BetP C Δ 25 wurden somit als teilweise osmotisch reguliert (BetP C Δ 12) bzw. osmotisch nicht reguliert (BetP C Δ 25 und BetP C Δ 45) interpretiert.

3.2.3 Abhängigkeit der Aktivitäten von BetP, BetP C252T BetP C Δ 12, BetP C Δ 25 und BetP C Δ 45 von der intraliposomalen Kaliumionenkonzentration

Im rekonstituierten System ist die BetP-Aktivität von der lumenalen K⁺-Konzentration abhängig (Rübenhagen *et al.*, 2001). Interpretiert wurde diese Beobachtung in der Weise, dass BetP eine Erhöhung der cytoplasmatischen Kaliumionenkonzentration in Folge des Wasserausstroms unter hyperosmotischen Bedingungen wahrnimmt und daraufhin aktiviert wird. Da der osmotische Reiz der BetP-Aktivierung ein chemischer Stimulus ist, agiert der Osmosensor BetP somit in gleicher Weise wie ein Chemosensor.

In dieser Arbeit wurde die Frage untersucht, ob die C-terminale Extension direkt am molekularen Mechanismus der K⁺-abhängigen Aktivierung des Carriers beteiligt ist. Hierzu wurden Proteoliposomenpräparationen der Cystein-freien Variante und der C-terminalen Deletionsmutanten gewählt, die sich durch Variation des liposomalen K_Pⁱ-Puffers in ihren internen K⁺-Konzentrationen unterschieden (Abb. 9). Die Aufnahmeraten wurden unter isoosmolalen Bedingungen bestimmt, so dass eine Erhöhung der BetP-Aktivität allein durch die unterschiedlichen Kaliumionenkonzentrationen beeinflusst wurde. Das Ergebnis ist in Abbildung 9 ersichtlich. Jeder Messpunkt repräsentiert eine separate Liposomenpräparation. Isoosmolalität zwischen dem lumenalen und extraliposomalen Puffer wurde durch Zugabe von Sorbitol zum externen Puffer gewährleistet. Die Konzentration des Cosubstrats Na⁺ wurde bei 61 mM konstant gehalten. Wie in der Abbildung 9 ersichtlich, wurden BetP C252T, sowie, in etwas geringerem Ausmaß, die Variante BetP C Δ 12 durch eine Erhöhung der intraliposomalen K⁺-Konzentration aktiviert. Im Gegensatz dazu konnte bei BetP C Δ 25 und BetP C Δ 45 keine Aktivierung durch K⁺ beobachtet werden. Somit führte die Verkürzung der

C-terminalen Domäne um 25 bzw. 45 Aminosäuren zu einem Verlust der chemosensorischen Eigenschaft von BetP.

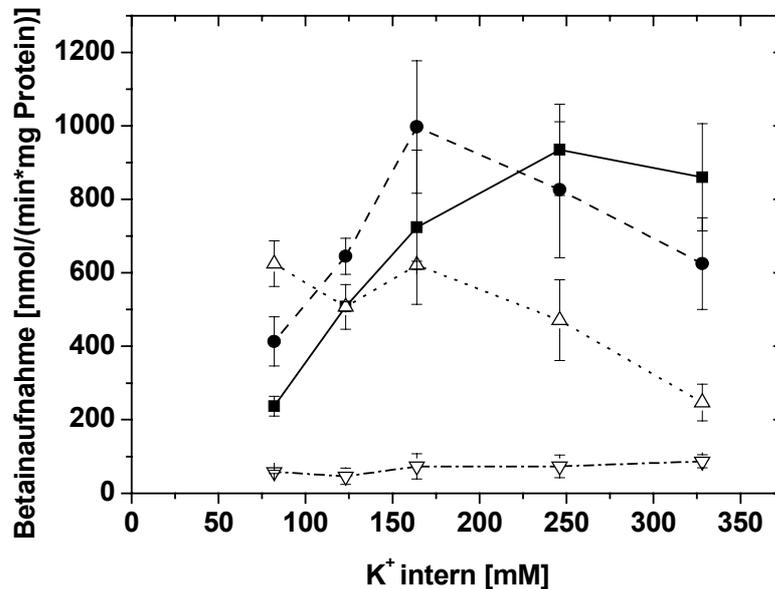


Abb. 9: Aktivitätsregulation von BetP C252T und seiner C-terminal verkürzten Varianten BetP CA12, BetP CA25 und BetP CA45 in Abhängigkeit der intraliposomalen K⁺-Konzentration. Der interne Puffer enthielt 45,6, 68,4, 91,2, 136,8 und 182,4 mM K_P_i, pH 7,5. Dies entsprach internen K⁺-Konzentrationen von 82, 123, 164, 246 und 328 mM. Der externe Puffer enthielt 20 mM NaP_i, pH 7,5, 25 mM NaCl (100 mosmol/kg). Isoosmolalität zwischen internem und externem Puffer wurde durch Zugabe von Sorbitol zum externen Puffer eingestellt. BetP C252T (Quadrate), BetP CA12 (Kreise), BetP CA25 (offene Dreiecke) und BetP CA45 (offene umgekehrte Dreiecke).

3.2.4 Bestimmung der kinetischen Parameter (K_m und V_{max}) für Betain und Na⁺ von BetP und C-terminal verkürzten BetP-Varianten in Proteoliposomen.

Zur richtigen Interpretation der in Proteoliposomen gewonnenen Daten war eine genaue Kenntnis der Affinitäten von rekonstituiertem BetP und seiner C-terminal verkürzten Derivate zu den transportierten Substraten erforderlich, da nicht auszuschließen war, dass Deletionen innerhalb der C-terminalen Domäne zu geänderten Substrataffinitäten führen. Zur Bestimmung des K_m für Betain wurde BetP C252T sowie die C-terminal verkürzten BetP-Varianten in *E. coli*-Liposomen rekonstituiert und die Transportaktivitäten bei einer konstanten externen Osmolalität von 0,6 mosmol/kg bei zunehmenden externen Betainkonzentrationen bestimmt. Entsprechend wurden zur Bestimmung des apparenten K_m für Na⁺ die Transportaktivitäten in Abhängigkeit der externen NaCl-Konzentrationen gemessen. Die externen Osmolalitäten wurden für jeden Ansatz mit Sorbitol auf 0,6 osmol/kg

eingestellt. Die Affinitäten zu Na^+ wurden somit indirekt über die Na^+ -abhängige Betainaufnahme bestimmt. Das Ergebnis dieser kinetischen Untersuchungen ist in Tabelle 5 zusammengefasst:

Tab. 5: Kinetische Parameter von BetP, BetP C252T und der C-terminal verkürzten Deletionsmutanten BetP C Δ 12, BetP C Δ 25 und BetP C Δ 45 in Proteoliposomen ($n \geq 5$).

Protein	Glycinbetain		Na^+
	K_m [μM]	V_{max} [nmol/min*mg Protein]	K_m [mM]
BetP	$3,0 \pm 0,3$	1693 ± 44	$38,1 \pm 1,9$
BetP C252T	$3,8 \pm 0,6$	3222 ± 136	$46,7 \pm 6,9$
BetP C Δ 12	$5,1 \pm 0,9$	3360 ± 206	$44,2 \pm 2,9$
BetP C Δ 25	$4,0 \pm 0,7$	3288 ± 192	147 ± 16
BetP C Δ 45	$1,9 \pm 0,5$	470 ± 27	130 ± 19

Die Affinitäten der untersuchten BetP Varianten zu Betain waren im Bereich von 2-5 μM vergleichbar zum Wildtypprotein (3,6 μM). während sich die Affinitäten zum Cosubstrat Na^+ deutlich unterschieden. Die Affinitäten zum Cosubstrat waren bei BetP, BetP C252T und BetP C Δ 12 mit Werten von 38,1, 46,7 und 44,2 mM vergleichbar. Im Gegensatz dazu führte eine weitere Verkürzung der C-terminalen Domäne zu einer Erhöhung des apparenten K_m für Na^+ . Die Deletionsmutanten BetP C Δ 25 und BetP C Δ 45 hatten mit den beobachteten K_m -Werten für Na^+ von 147 bzw. 130 mM eine geringere Affinität zum Cosubstrat. Die ermittelten V_{max} waren für die Cystein-freien BetP-Varianten etwa zweifach höher im Vergleich zum Wildtypprotein, außer für BetP C Δ 45. Diese Mutante zeichnete sich durch eine geringere maximale Transportaktivität mit V_{max} von 876 nmol/min*mg Protein aus.

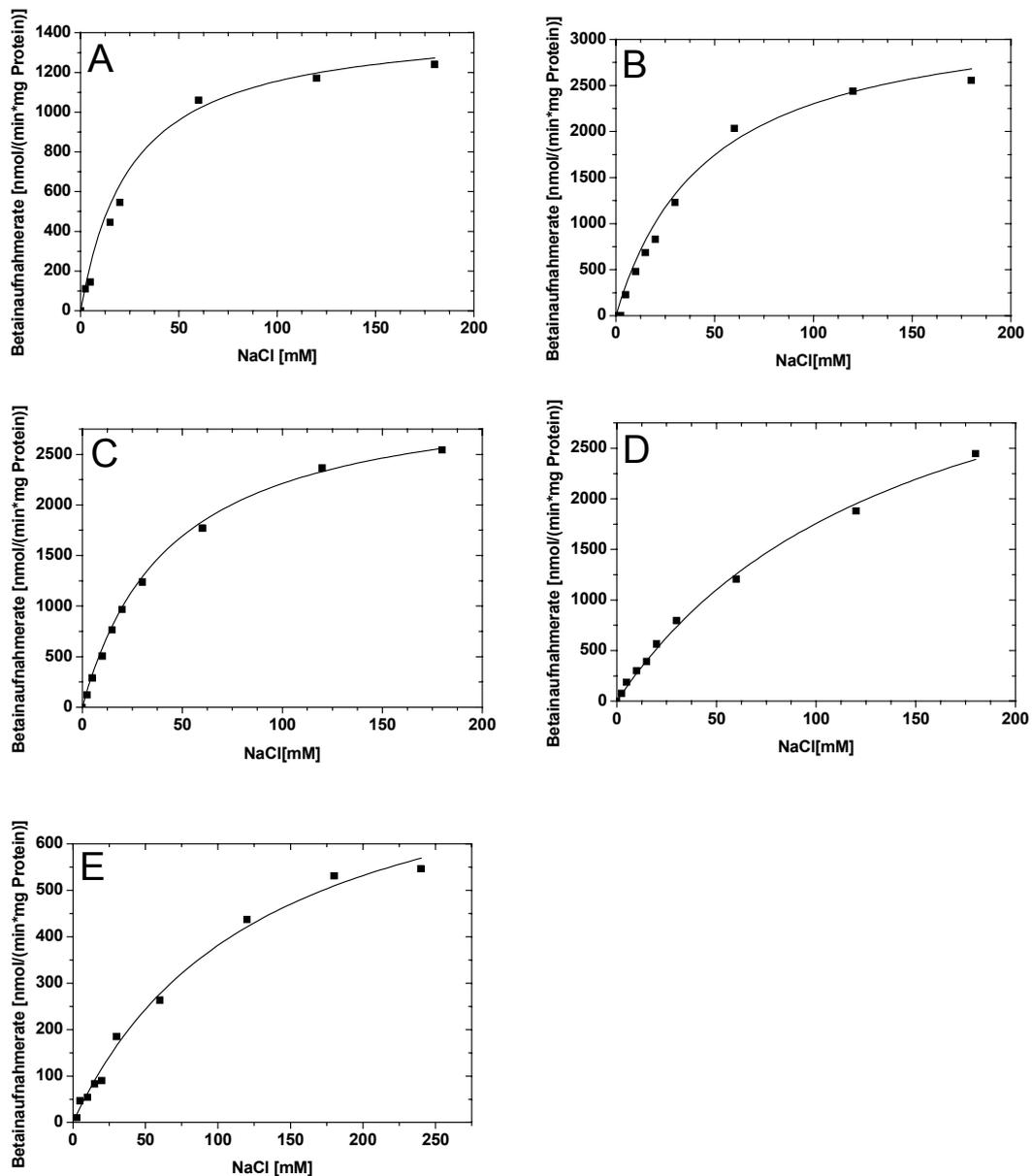


Abb. 10: Bestimmung der apparenten Na^+ -Affinität von BetP, BetP C252T und seiner C-terminal verkürzten Derivate in Proteoliposomen. Der apparente K_m für Na^+ wurde anhand der Betinaufnahmerate unter verschiedenen externen Na^+ -Konzentrationen ermittelt. Externer Puffer: 100 mM Tris/Mes pH 7,5. Die konstante Osmolalität des externen Puffers von 0,6 osmol/kg wurde durch Zugabe von Sorbitol eingestellt. **A:** BetP Wildtyp, **B:** BetP C252T, **C:** BetP CA12, **D:** BetP CA25 und **E:** BetP CA45. Die Messpunkte stellen Mittelwerte aus jeweils mindestens 3 Bestimmungen dar.

3.2.5 Orientierung von BetP C252T und BetP C252T CA25 in Proteoliposomen

Untersuchungen zur Orientierung von BetP in der Cytoplasmamembran von *E. coli* bestätigten die computergestützte Topologievorhersage mit 12 Transmembranhelices und einer N- und C-terminalen Domäne, die zur cytoplasmatischen Seite gerichtet sind (Peter *et*

al., 1998b; Rübénhagen *et al.*, 2001). Die Topologie des Proteins in Proteoliposomen konnte bisher nicht geklärt werden. Die genaue Kenntnis der Orientierung des Carriers und insbesondere seiner C-terminal verkürzten Mutanten in Proteoliposomen würde Aussagen darüber erlauben, welche Proteindomänen an der Wahrnehmung von Kaliumionen als osmotischen Stimulus beteiligt sein können.

In dieser Arbeit wurde der unidirektionale Einbau der Cystein-freien Mutante BetP C252T und der C-terminal verkürzten Variante BetP C Δ 25 in die Lipiddoppelschicht sowohl immunologisch, als auch mit Hilfe von ortsspezifischer Proteolyse über die Zugänglichkeit der C-terminalen Extension von der extra- oder intraliposomalen Seite her nachgewiesen. Dazu wurden Proteoliposomen mit polyklonalen Antikörpern, die zum einen gegen das Gesamtprotein und zum anderen gegen die C-terminale Domäne gerichtet waren, inkubiert. Zum Nachweis intraliposomal gelegener Proteindomänen wurden die spezifischen Antikörper durch mehrere Zyklen von Frieren und Tauen und nachfolgendem Extrudieren in das Lumen der Proteoliposomen eingeschlossen. Anschließend wurden die Protein-Antikörperkomplexe mit Hilfe der denaturierenden SDS-PAGE (7,5%) getrennt und die spezifischen Immunglobuline durch sekundäre Antikörper (Alkalische Phosphatase-Konjugate) detektiert. Zur Kontrolle einer möglichen unspezifischen Bindung an die Vesikel wurden Liposomen in gleicher Weise behandelt. Das Ergebnis dieses Experimentes ist in Abbildung 11A dargestellt. Während sich Antikörper, die gegen das gesamte Protein gerichtet sind, sowohl bei externer Zugabe als auch nach Einschluss in die Proteoliposomen nachweisen ließen, wurden Antikörper, die gegen die C-terminale Extension gerichtet sind, nur nach vorherigem Einschluss in die Liposomen detektiert. Um im letzteren Fall zwischen einfachem Einschluss in die (Proteo)liposomen und spezifischer Bindung der Antikörper an intraliposomal orientierten Proteindomänen zu unterscheiden, wurden die vorgeformten (Proteo)liposomen zweimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren bei RT wieder aufgetaut, extrudiert, gewaschen und wieder in Antikörper-freiem Puffer resuspendiert. Dieser Zyklus wurde zweimal wiederholt und Proben nach zwei-, vier- und sechsmaligem Schockgefrieren über SDS-PAGE analysiert. Bereits nach viermaligem Frieren/Tauen waren keine Antikörper im Lumen von BetP-freien Liposomen nachweisbar. In Proteoliposomen hingegen, blieb die Menge an Antikörpern auch nach sechsmaligem Frieren/Tauen unverändert. Gegen die C-terminale Domäne gerichtete Antikörper waren nur nach Einschluss in die Proteoliposomen, nicht aber nach externer Zugabe zur Proteoliposomensuspension nachweisbar. Da dieses Phänomen ebenfalls für die C-terminal verkürzte Variante BetP C Δ 25 beobachtet werden konnten, wurde gefolgert, dass BetP in Liposomen aus *E. coli*-Lipiden *right-side-out*

eingebaut wird, d.h., dass die N- bzw. die C-terminale Domäne im Lumen der Proteoliposomen lokalisiert ist.

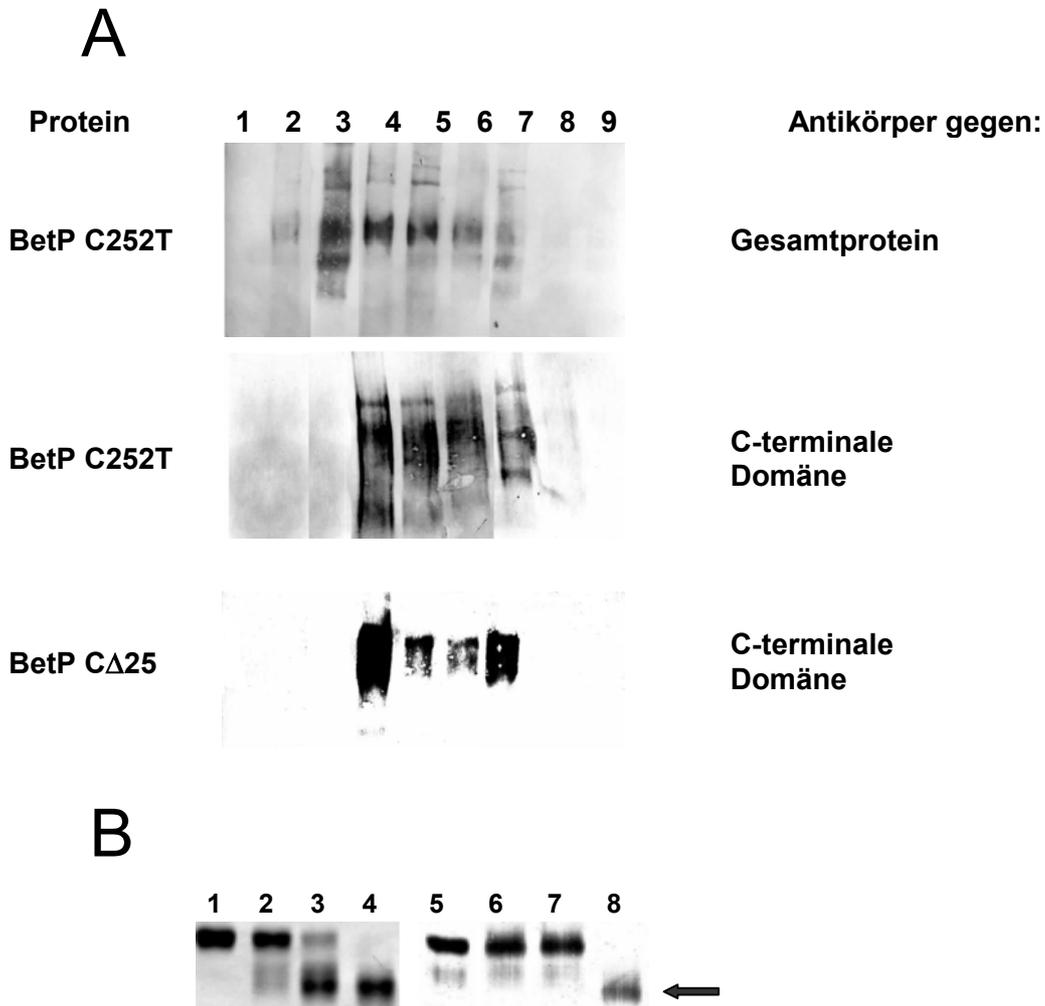


Abb. 11: Orientierung von BetP C252T und BetP CΔ25 in Proteoliposomen. (A) (Proteo)liposomen wurden mit Antikörpern gegen das Gesamtprotein oder gegen die C-terminale Domäne oder Präimmunseren (Spur 1) inkubiert. Liposomen (2), Proteoliposomen (3) und Proteoliposomen (4-6), sowie Liposomen (7-9) mit eingeschlossenen Antikörpern (4-9) nach zwei-, vier- und sechsmaligem Frieren/Tauen. (B) Solubilisiertes Protein (1-4) oder Proteoliposomen (5-8) wurden mit Aminopeptidasen für 0, 0,5, 4 und 12 (1-4) oder 0, 4 und 12h (5-7) inkubiert. Erst nach Solubilisierung der Proteoliposomen durch Zugabe von Triton X-100 war die C-terminale Domäne von rekonstituiertem BetP für die Proteasen zugänglich (8) Der Pfeil weist auf das ca. 35 kDa große unverdauliche Fragment von BetP hin.

Diese Interpretation wurde durch proteolytische Analysen gestützt (Abb. 11B). Hierbei wurden Proteoliposomen und zum Vergleich solubilisiertes BetP mit Aminoexopeptidasen inkubiert und der sukzessive N-terminale Abbau über SDS-PAGE verfolgt. Wie in Abbildung 11 B ersichtlich, ist solubilisiertes BetP bereits nach 12 Stunden bis zu einer Größe von etwa

35-40 kDa abgebaut. Ein weiterer Abbau des solubilisierten Proteins war sowohl bei Verlängerung der Inkubationszeit als auch bei Erhöhung der Proteasekonzentration nicht zu beobachten. In Proteoliposomen konnte keine N-terminale Verkürzung beobachtet werden. Hier erfolgte ein N-terminaler Verdau des Carriers erst nach vollständiger Solubilisierung der Proteoliposomen mit Triton X-100 (2,9 µg Triton X-100/mg Lipid).

Wie bereits beim solubilisierten Protein beobachtet werden konnte, wird auch in diesem Ansatz BetP nur bis zu einer Größe von ca. 35-40 kDa verkürzt. Offensichtlich treffen die Proteasen in diesem Bereich auf eine Aminosäuresequenz, die keinen weiteren Abbau des Carriers erlaubt.

3.3 Ortsgerichtete Mutagenese der C-terminalen Domäne

Untersuchungen zur Kaliumionen-spezifischen Aktivierung der C-terminal verkürzten BetP-Varianten ergaben, dass das Fehlen der letzten 25 Aminosäuren mit einem Verlust der Kaliumionensensitivität einhergeht (Abb. 9). Somit könnte die für die Reizwahrnehmung und für die BetP-Aktivierung verantwortliche Proteindomäne innerhalb der letzten 25 Aminosäuren lokalisiert sein. Durch ortsspezifische Mutagenese innerhalb dieser Proteindomäne sollten Aminosäuren identifiziert werden, die an der K⁺-Wahrnehmung und an der Osmoregulation von BetP maßgeblich beteiligt sind.

3.3.1 Alanine scanning der C-terminalen Sensordomäne

Mit Hilfe eines *alanine scannings* sollten die in der Osmosensorik von BetP involvierten Aminosäuren der C-terminalen Extension identifiziert werden. Hierzu wurden innerhalb der letzten 24 C-terminalen Aminosäuren jeweils drei aufeinanderfolgende Aminosäuren durch je ein Alanin ersetzt (Tab. 6). Anschließend wurde die Transportaktivität der auf diese Weise konstruierten BetP-Varianten in Abhängigkeit von der externen Osmolalität im Stamm *E. coli* MKH13 bestimmt (vergl. 3.1.1). Das Ergebnis dieser Experimente ist in Abbildung 12 dargestellt. Alle BetP-Varianten waren in *E. coli*-Zellen funktionell aktiv, unterschieden sich jedoch zum Teil in den absoluten Transportraten. Aus diesem Grund wurde zum Vergleich der Auswirkungen der einzelnen Mutationen das Ausmaß der osmotisch induzierten Carrieraktivität herangezogen. Hierzu wurde bestimmt, um welchen Faktor sich die absolute Betainaufnahmerate bei externen Osmolalitäten von 0,2 osmol/kg bis 0,6 bzw. 0,8 osmol/kg erhöhte (Abb. 13). Demnach konnten für BetP C252T sowie für die Tripelmutante 590AAA

Tab. 6: Alanine scanning der endständigen 24 Aminosäuren der C-terminalen Extension von BetP

BetP-Variante	C-terminale Aminosäuren
	...571.....595
C252T	...NEHRKRELAAKRRRERKASGAGKRR
572AAA	... AAA KRELAAKRRRERKASGAGKRR
575AAA	...NEHR AAA LAAKRRRERKASGAGKRR
578AAA	...NEHRKRE AAA KRRRERKASGAGKRR
581AAA	...NEHRKRELA AAA REKASGAGKRR
584AAA	...NEHRKRELAAKRR AAA KASGAGKRR
587AAA	...NEHRKRELAAKRRREF AAA GAGKRR
590AAA	...NEHRKRELAAKRRRERKAS AAA KRR
593AAA	...NEHRKRELAAKRRRERKASGAG AAA

mit Betainaufnahmeraten von 27,1 und 28,3 nmol/(min*mg TG) bei 0,2 osmol/kg und 91,3 und 94,3 nmol/(min*mg TG) bei 0,6 bzw. 0,8 osmol/kg eine Aktivierung um die Faktoren 3,4 bzw. 3,3 beobachtet werden. Im Vergleich dazu wurden für die weiteren Austauschmutanten abweichende Aktivierungsfaktoren bestimmt. Der jeweilige Austausch von drei nativen Aminosäuren gegen ein Alanintriplet beginnend an den Positionen 584, 587 und 593 erhöhte

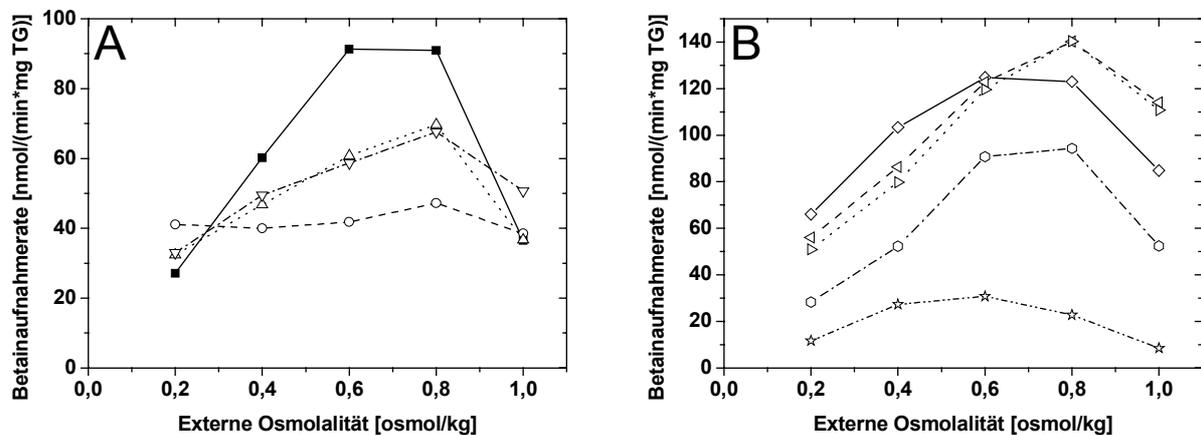


Abb. 12: Transportaktivität von BetP C252T und C-terminalen BetP-Varianten in Abhängigkeit der externen Osmolalität in *E. coli* MKH13. Die Osmolalität des externen Puffers (100 mM Tris/Mes pH 7,5, 50 mM NaCl) wurde durch Sorbitol erhöht. Die Aufnahmemessung wurde durch Zugabe von 250 μ M 14 C-Glycinbetain gestartet. Die Aufnahmeaktivitäten folgender MKH13/pBetP C252T-Stämme ist gezeigt: (A): C252T (Quadrat), 572AAA (Kreise), 575AAA (aufrechte Dreiecke) 578AAA (umgedrehte Dreiecke). (B): 581AAA (Diamanten), 584AAA (Dreiecke links), 587AAA (Dreiecke rechts), 590AAA (Diamanten) und 593AAA (Sterne).

die Proteinaktivität um die Faktoren 2,5 bis 2,8. Die Aufnahmeaktivitäten der Mutanten 575AAA, 578AAA, 581AAA und 572AAA erhöhten sich jeweils um die Faktoren 2,2, 2, 1,9 und 1,1. Somit hatte der Austausch von drei nativen Aminosäuren an den Positionen 572-574 gegen ein Alanintriplet den stärksten Einfluss auf die osmoregulatorische Eigenschaft des Plasmid-kodierten Transporters. Demnach sind entweder alle oder einzelne Aminosäurereste an dieser Position (572-574) in der osmotisch regulierten Aktivität von BetP unter physiologischen Bedingungen in *E. coli* beteiligt.

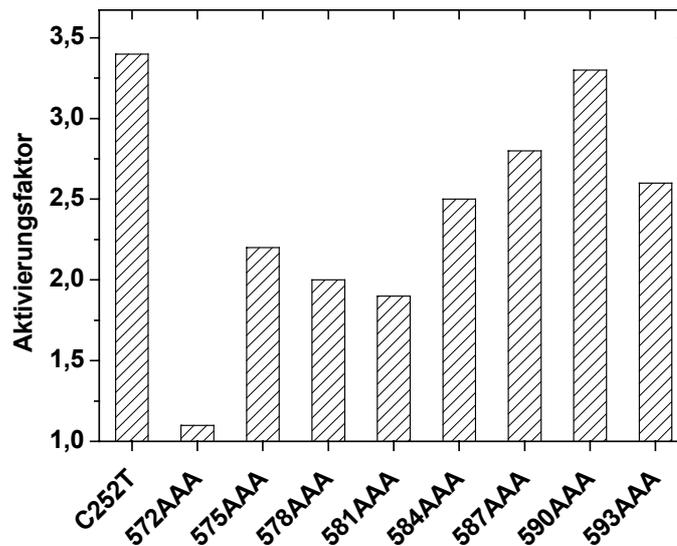


Abb. 13: Aktivierungsfaktoren von BetP-Varianten in *E. coli* MKH13. Maximale Erhöhung der Betainaufnahme in Abhängigkeit von der externen Osmolalität.

3.3.2 Glutamataustauschmutanten innerhalb der Sensordomäne

Zusätzlich zu dem unter 3.3.1 beschriebenen *alanine scanning* der C-terminalen Domäne wurden weitere Aminosäuren ausgetauscht. Da der osmotisch relevante Stimulus der BetP-Aktivierung die Erhöhung der internen K^+ -Konzentration ist, könnten negativ geladene Aminosäurereste innerhalb der Sensordomäne für die Wahrnehmung von Kaliumionen verantwortlich sein. Innerhalb der letzten 25 Aminosäuren sind drei Glutamatreste lokalisiert, die einzeln und in Zweier- bzw. Dreierkombination gegen Glutamin ausgetauscht wurden (Tab. 7). Die Osmoregulation dieser Plasmid-kodierten Glutamataustauschmutanten wurde in *E. coli* MKH13 untersucht (Abb. 14A). Der gleichzeitige Austausch von drei Glutamatresten an den Positionen 572, 577 und 585 gegen Glutamin führte zu einer BetP-Variante, die in ihrer Betainaufnahme nicht mehr durch Erhöhung der externen Osmolalität aktivierbar war. Die Aktivitäten der BetP-Variante E577/585Q sowie der Einzelmutante E572Q erhöhten sich

Tab. 7: Substitution von Glutamat innerhalb der endständigen 24 Aminosäuren der C-terminalen Extension von BetP.

BetP-Variante	C-terminale Aminosäuren
	...571.....595
C252T	...NEHRKRELAAKRRRERKASGAGKRR
E572Q	...N Q HRKRELAAKRRRERKASGAGKRR
E577Q	...NEHRK R QLAAKRRRERKASGAGKRR
E585Q	...NEHRKRELAAKRRR R QKASGAGKRR
E577/585Q	...NEHRK R QLAAKRRR R QKASGAGKRR
E572/577/585Q	...N Q HRK R QLAAKRRR R QKASGAGKRR

im Bereich von 0,2 osmol/kg bis 0,8 osmol/kg um die Faktoren 1,6 bzw. 1,7. Den geringsten Effekt hatte die Substitution des Glutamats bei den BetP-Varianten E577Q und E585Q. Beide wiesen osmotische Aktivierungsprofile auf, die der Variante C252T ähnelten. Da der Austausch der Aminosäuren E572, H573 und R574 gegen ein Alanintriplet, sowie der Austausch des Glutamatrestes an Position 572 gegen ein Glutamin in einem deutlich veränderten osmoregulatorischen Verhalten von Plasmid-kodiertem BetP in *E. coli* resultierte (vergl. Abb. 13 und 15), wurde gefolgert, dass E572 maßgeblich an der osmoregulatorischen und osmosensorischen Eigenschaft von BetP beteiligt sein muss. Daher wurde im Hinblick auf weitergehende Untersuchungen einzelner BetP-Varianten im Proteoliposomensystem E572 gegen Lysin, Aspartat oder Cystein ersetzt (Abb. 14B). Der Austausch des Glutamats gegen ein Lysin oder Aspartat, sollte klären, ob die negative Ladung des nativen Glutamats für das *osmosensing* des Carriers von Bedeutung ist. Der Austausch gegen ein Cystein würde im Proteoliposomensystem die freie Variation der lokalen Ladung an dieser Position durch Reaktion mit Thiol-spezifischen geladenen und neutralen Reagenzien erlauben. In *E. coli*-Zellen zeigten die Glutamataustauschvarianten E572K, E572C und E572D maximale Transportraten von 20,7, 25,6 bzw. 28,8 nmol/(min*mg TG). Während BetP E572D ein reguliertes osmotisches Aktivierungsprofil aufwies, waren die C252T-Varianten E572K und E572C permanent aktiv und nicht durch Erhöhung der externen Osmolalität aktivierbar (Abb. 14B).

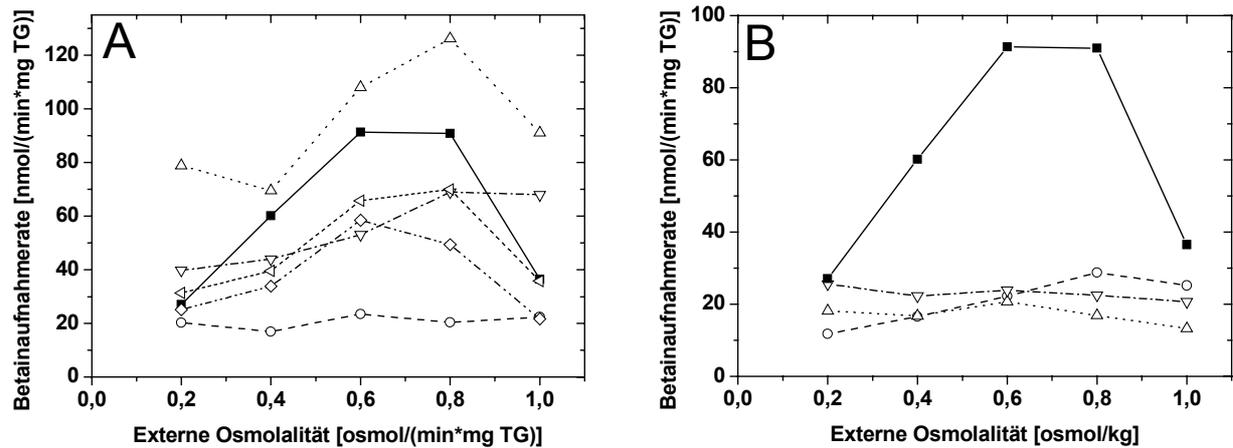


Abb. 14: Transportaktivität von BetP C252T und C-terminalen BetP-Varianten in Abhängigkeit der externen Osmolalität in *E. coli* MKH13. Externer Puffer: 100 mM Tris/Mes pH 7,5, 50 mM NaCl. Die Osmolalität des externen Puffers wurde durch Zugabe von Sorbitol erhöht. Die Aufnahmemessung wurde durch Zugabe von 250 μM ^{14}C -Glycinbetain gestartet. Die Aufnahmeaktivitäten folgender MKH13/pBetP C252T-Stämme ist gezeigt: **(A)** C252T (geschlossene Quadrate), E572/577/585Q (Kreise), E577/585Q (aufrechte Dreiecke), E572Q (umgedrehte Dreiecke), E577Q (Diamanten) und E585Q (Dreiecke links). **(B)** C252T (Quadrate), E572D (Kreise), E572K (Dreiecke) und E572C (umgedrehte Dreiecke).

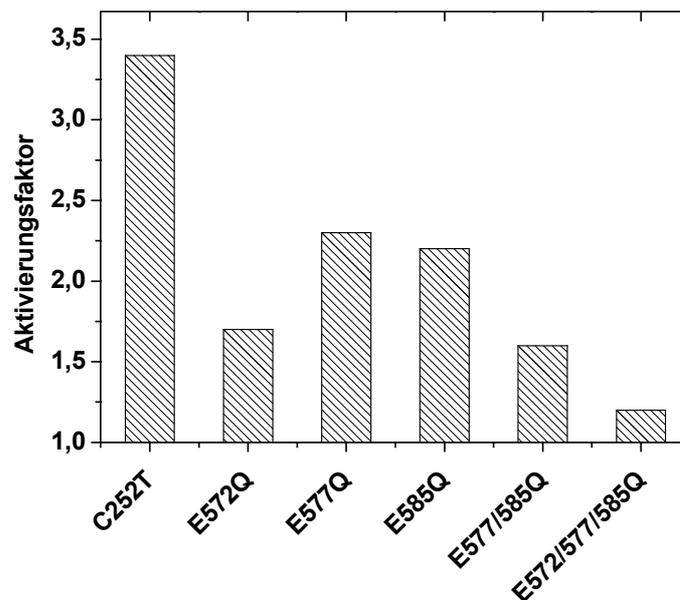


Abb. 15: Aktivierungsfaktoren von BetP-Varianten in *E. coli* MKH13. Maximale Erhöhung der Betainaufnahme in Abhängigkeit von der externen Osmolalität.

3.3.3 Osmoregulation C-terminaler BetP C252T Varianten in Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden

Untersuchungen zur Osmoregulation rekombinanter C-terminaler BetP Varianten in *E. coli* ergaben, dass der Austausch bestimmter Aminosäuren innerhalb der C-terminalen Domäne die Osmostress-abhängige Aktivitätsregulation von BetP beeinflusst. Um den Einfluss der einzelnen Mutationen auf die chemosensorische Eigenschaft von BetP detailliert untersuchen zu können, wurden einzelne BetP-Varianten, die sich in ihrem osmotischen Aktivierungsprofil *in vivo* deutlich vom Wildtyp unterschieden, gereinigt und in Liposomen aus *E. coli*-Phospholipiden rekonstituiert. Die Transportaktivität in Abhängigkeit der externen Osmolalität der BetP-Varianten wurde im Proteoliposomensystem getestet. (Abb. 16). Die ausgewählten rekombinanten Proteine waren durch Erhöhung der externen Osmolalität aktivierbar, allerdings fielen, wie bereits in Zellen beobachtet (vergl. Abb. 14), auch im rekonstituierten System die absoluten spezifischen Aktivitäten der C-terminalen Varianten im Vergleich zu BetP C252T deutlich geringer aus. Die osmotisch induzierten Transportaktivitäten der Proteine 572AAA und 581AAA waren auch im rekonstituierten System im Vergleich zur BetP C252T verringert (Abb. 16A). Während für BetP C252T eine Aktivitätssteigerung von 0,1 bis 0,6 osmol/kg um den Faktor 6,7 bestimmt werden konnte, erhöhten sich die Transportraten der BetP-Derivate 572AAA und 581AAA im gleichen Osmolalitätsbereich um die Faktoren 3 bzw. 2 (Abb. 17). Ein ähnliches Bild ergab sich für die Einzelaustauschvarianten E572Q, E572K, E572D und E572C (Abb. 16B und 17). Während der Austausch des nativen Glutamats an Position 572 gegen ein Glutamin die Aktivierbarkeit nur geringfügig beeinträchtigte (Faktor 5), war die Steigerung Betainaufnahme der übrigen Mutanten um die Faktoren 1,6 bis 2 im Bereich einer externen Osmolalität von 0,1 bis 0,6 osmol/kg deutlich geringer. Im Vergleich zu BetP C252T waren die osmotischen Aktivierungsprofile der BetP-Varianten 572AAA, 581AAA, E572Q, E572K, E572D und E572C deutlich durch die Substitutionen beeinflusst. Auf Grund der geringen absoluten spezifischen Transportaktivitäten waren diese BetP-Derivate nur noch in geringerem Maße durch Erhöhung der externen Osmolalität aktivierbar, was sich in den geringeren Aktivierungsfaktoren wider spiegelte.

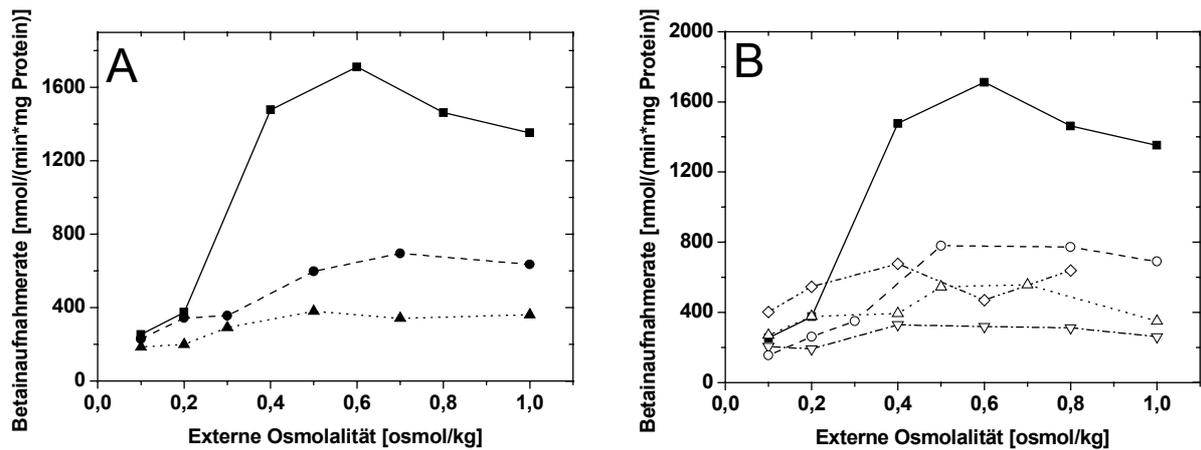


Abb. 16: Aktivitätsregulation von BetP C252T und seiner C-terminalen Derivate in Proteoliposomen in Abhängigkeit der externen Osmolalität. Die Betainaufnahme in Proteoliposomen wurde unter hyperosmotischen Bedingungen bestimmt. Der interne Puffer enthielt 100 mM KP_i , pH 7,5 und hatte eine Osmolalität von 0,22 osmol/kg. Der externe Puffer enthielt 20 mM NaP_i , pH 7,5, 25 mM NaCl und hatte eine Osmolalität von 0,1 osmol/kg. Höhere externe Osmolalitäten wurden durch Zugabe von Sorbitol eingestellt. Gezeigt ist die osmotisch induzierte Aufnahme von Betain durch: **(A)** BetP C252T (Quadrate), 572AAA (Kreise), 581AAA (Dreiecke). **(B)** BetP C252T (Quadrate), E572Q (Kreise), E572K (Dreiecke), E572C (umgedrehte Dreiecke) und E572D (Diamanten).

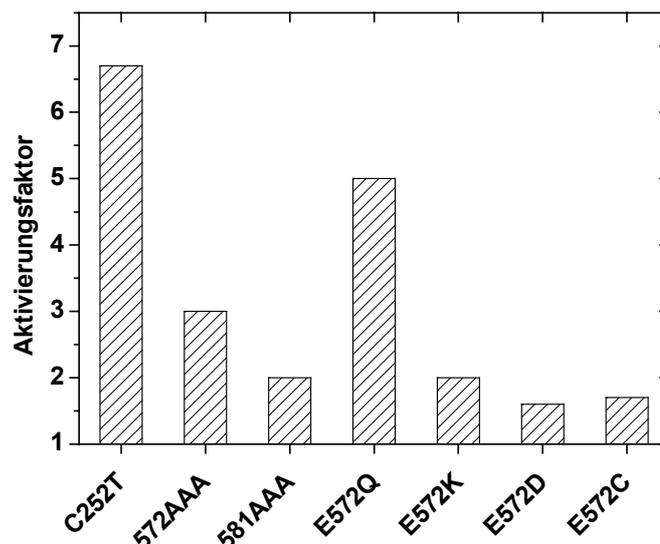


Abb. 17: Aktivierungsfaktoren von BetP-Varianten in Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden. Maximale Erhöhung der Betainaufnahme in Abhängigkeit von der externen Osmolalität.

3.3.4 Chemosensing C-terminaler BetP C252T Mutanten in Proteoliposomen aus *E. coli* Lipiden

Untersuchungen zur Osmoregulation in *E. coli* und in Proteoliposomen zeigten, dass Glutamat an Position 572 innerhalb der C-terminalen Domäne an der Aktivitätsregulation unter hyperosmotischen Bedingungen beteiligt sein muss (vergl. Abb. 14 und 16). Weiterhin führte der Verlust der endständigen 25 C-terminalen Aminosäuren zu einer Insensitivität des Carriers gegenüber Kaliumionen als osmotischen Stimulus (vergl. Abb. 9). Somit könnte E572 direkt an einer möglichen Wahrnehmung von Kaliumionen beteiligt sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine mögliche K^+ -abhängige Aktivierung der Mutanten 572AAA, E572Q, E572K und E572D im rekonstituierten System untersucht (Abb. 18, vergl. 3.1.2).

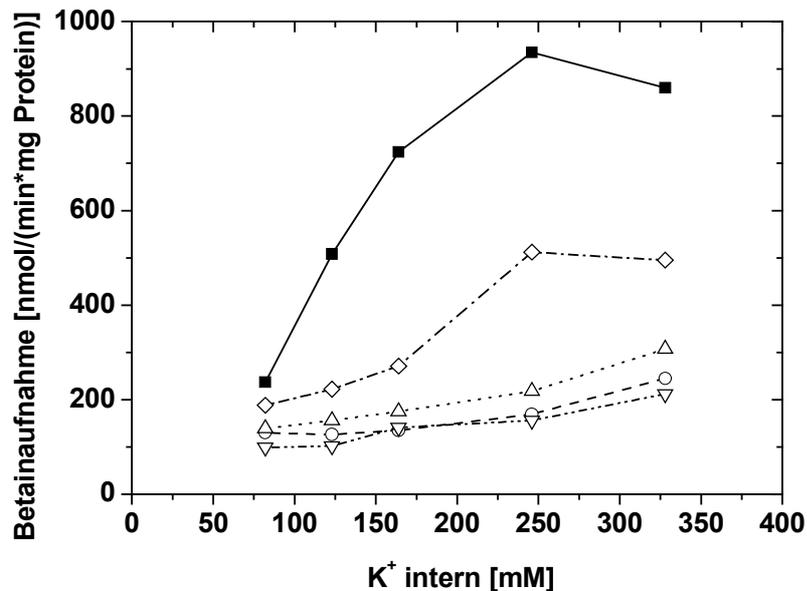


Abb. 18: Aktivitätsregulation von BetP C252T und seiner C-terminalen Derivate in Abhängigkeit der intraliposomalen K^+ -Konzentration. Der interne Puffer enthielt 45,6, 68,4, 91,2, 136,8 oder 182,4 mM KP_i pH 7,5. Dies entsprach internen K^+ -Konzentrationen von 82, 123, 164, 246 und 328 mM. Der externe Puffer enthielt 20 mM NaP_i , pH 7,5, 25 mM NaCl (100 mosmol/kg). Isoosmolalität zwischen internem und externem Puffer wurde durch Zugabe von Sorbitol zum externen Puffer eingestellt. BetP C252T (Quadrat), 572AAA (Kreise), E572Q (Dreiecke), E572K (umgekehrte Dreiecke) und E572D (Diamanten).

Während die Transportaktivität von BetP C252T unter isoosmolalen Bedingungen durch eine Erhöhung der internen K^+ -Konzentrationen von 82 auf 328 mM um den Faktor 3,6 erhöht wurde, wurden Aktivierungsfaktoren von 1,9, 2,2, 2,1 und 2,6 für 572AAA, E572Q, E572K und E572D bestimmt. Für diese BetP-Varianten konnte somit eine eindeutige Korrelation

zwischen der Transportaktivität von BetP unter hyperosmotischem Stress (vergl. Abb. 16) und einer Kaliumionensensitivität des Carriers bestimmt werden, die allerdings im Vergleich zur C-terminal verkürzten BetP-Variante BetP C Δ 25 weniger ausgeprägt war (Abb. 19). Während BetP C252T osmoreguliert war und durch interne Kaliumionen aktiviert werden konnte, waren die BetP-Derivate 572AAA, E572Q, E572K und E572D nur vermindert osmotisch aktivierbar und zeigten eine geringe, aber signifikante Sensitivität gegenüber internen K⁺-Erhöhungen. Auf Grund dieser Beobachtungen konnte gefolgert werden, dass in *E. coli*-Zellen und in Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden E572 innerhalb der C-terminalen Domäne von entscheidender Bedeutung für die Osmoregulation und für die Wahrnehmung osmotisch induzierter interner Kaliumionenerhöhungen ist.

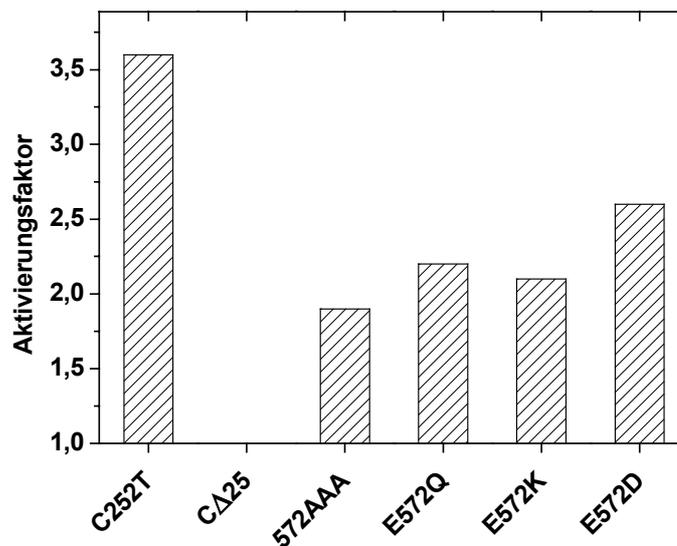


Abb. 19: Aktivierungsfaktoren von BetP-Varianten in Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden. Maximale Erhöhung der Betainaufnahmerate in Abhängigkeit von der internen K⁺-Konzentration.

3.4 Osmoregulation von BetP in Abhängigkeit der Membranumgebung

Die bisherigen Untersuchungen zur Osmoregulation und zum chemosensorischen Verhalten von BetP erfolgten entweder in *E. coli*-Zellen oder in Proteoliposomen bestehend aus *E. coli*-Lipiden. Aus früheren Arbeiten war allerdings bekannt, dass die Membranumgebung Einfluss auf die osmoregulatorischen Eigenschaften von BetP nehmen kann. So ist das Maximum der Transportaktivität von BetP sowohl in *C. glutamicum* als auch in Phosphatidylglycerin-dotierten Liposomen aus *E. coli*-Lipiden im Vergleich zu *E. coli*-Zellen oder Liposomen aus *E. coli*-Lipiden zu höheren Osmolalitäten verschoben (Peter *et al.*, 1998b, Rübenhagen *et al.*, 2000). Die Untersuchung der osmoregulatorischen Eigenschaften verschiedener C-terminaler BetP Varianten in ihrer nativen Membranumgebung würde einen direkten Vergleich zur bisher beobachteten Osmoregulation und K^+ -Sensitivität in *E. coli* MKH13 und in Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden erlauben. Zunächst wurden Studien zur relativen Expression und zur Substrataffinität einzelner Transportervarianten in ganzen Zellen von *E. coli* und *C. glutamicum* durchgeführt.

3.4.1 Apparente Natriumionenaffinitäten verschiedener C-terminaler Mutanten in *E. coli* MKH13 und *C. glutamicum* DHPF

Untersuchungen der C-terminalen BetP-Varianten im rekonstituierten System ergaben, dass eine zunehmende Verkürzung der C-terminalen Domäne mit einer Abnahme der Affinität zum Cosubstrat Na^+ einhergeht. Da bei allen Aufnahmemessungen sowohl in Zellen als auch in Proteoliposomen die Na^+ -Konzentrationen der externen Puffer stets konstant gehalten wurden (61 mM Na^+ bei Proteoliposomen und 50 mM Na^+ bei Zellen) kann bei den BetP-Derivaten mit einer niedrigen Aufnahmerate nicht zwischen den Aktivitätszuständen „dereguliert“ oder „nicht mehr aktivierbar“ unterschieden werden. „Dereguliert“ bedeutet, dass der Transporter unabhängig von der externen Osmolalität maximal aktiv ist, während geringe Aktivierbarkeit bedeutet, dass sich die Aufnahmerate dieser BetP-Variante nicht über die Grundaktivität von BetP C252T hinaus in Abhängigkeit der externen Osmolalität erhöht. Daher muss bei solchen Mutanten stets die apparente Na^+ -Affinität zur richtigen Interpretation des Betainaufnahmeverhaltens unter hyperosmotischen Bedingungen berücksichtigt werden.

Zur Bestimmung der apparenten Na^+ -Affinitäten in Zellen wurde die Betainaufnahmerate unter Zunahme der externen Na^+ -Konzentrationen bestimmt. Die externe Osmolalität wurde durch Zugabe von Sorbitol konstant gehalten (0,6 osmol/kg für *E. coli* und 1,2 osmol/kg für *C. glutamicum*). Die Ergebnisse dieser K_m -Bestimmungen sind in den Abbildungen 20 und 21

ersichtlich und in der Tab. 8 zusammengefasst. Die Bestimmung des apparenten K_m für Na^+ für die C-terminal verkürzte Mutante BetP C Δ 25 war tendenziell in Übereinstimmung zu den Ergebnissen in Proteoliposomen, d.h., mit der Verkürzung der C-terminalen Extension ging eine Abnahme der Affinität zum Cosubstrat Na^+ einher. Die unterschiedlich hohen spezifischen Aktivitäten (V_{max}) und K_m -Werte könnten auf unterschiedliche Proteinmengen auf Grund unterschiedlich hoher Expression der einzelnen Gene hindeuten. Daher wurden Untersuchungen zur Expression der einzelnen BetP Mutanten in *E. coli* und in *C. glutamicum* durchgeführt (vergl. 3.4.2).

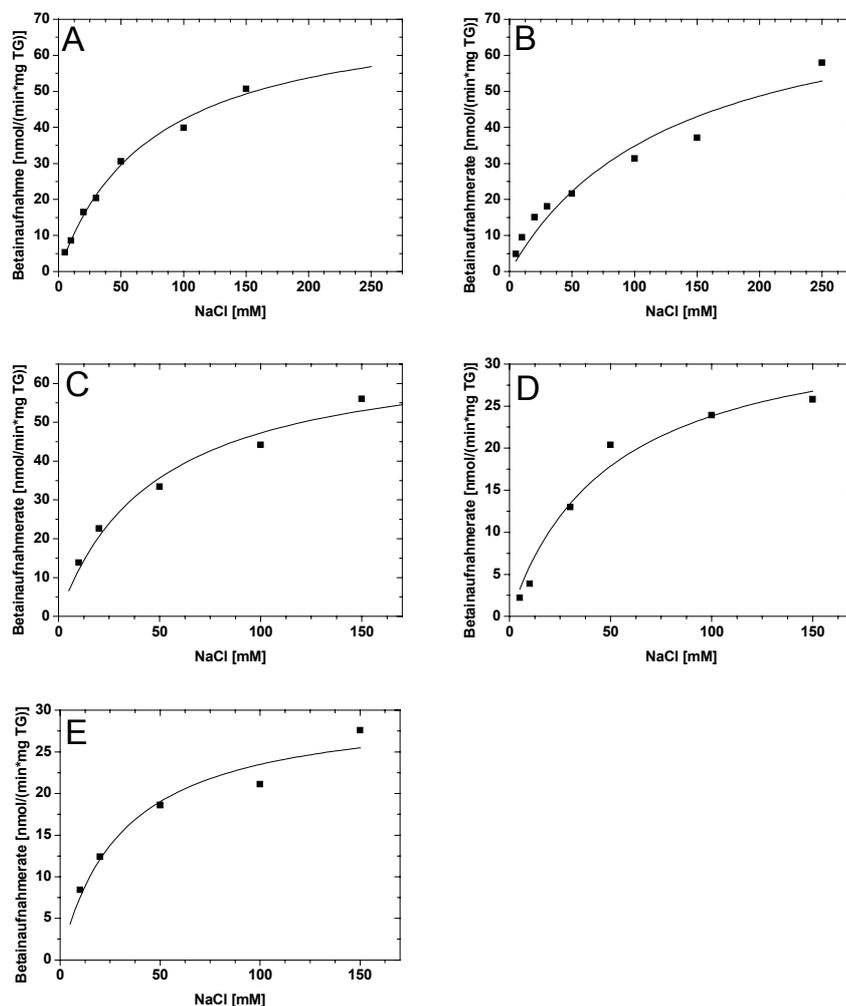


Abb. 20: Bestimmung der apparenten Na^+ -Affinität verschiedener BetP-Varianten im Stamm *E. coli* MKH13 anhand der Betainaufnahme unter verschiedenen externen Na^+ -Konzentrationen. Externer Puffer: 100 mM Tris/Mes pH 7,5, mit entsprechender NaCl-Konzentration. Die Osmolalität des externen Puffers von 0,6 osmol/kg wurde durch Zugabe von Sorbitol eingestellt. Die Aufnahmemessung wurde durch Zugabe von 250 μM ^{14}C -Glycinbetain gestartet. **A:** BetP C252T **B:** BetP C Δ 25 **C:** BetP E572Q **D:** BetP E572K und **E:** BetP 572AAA.

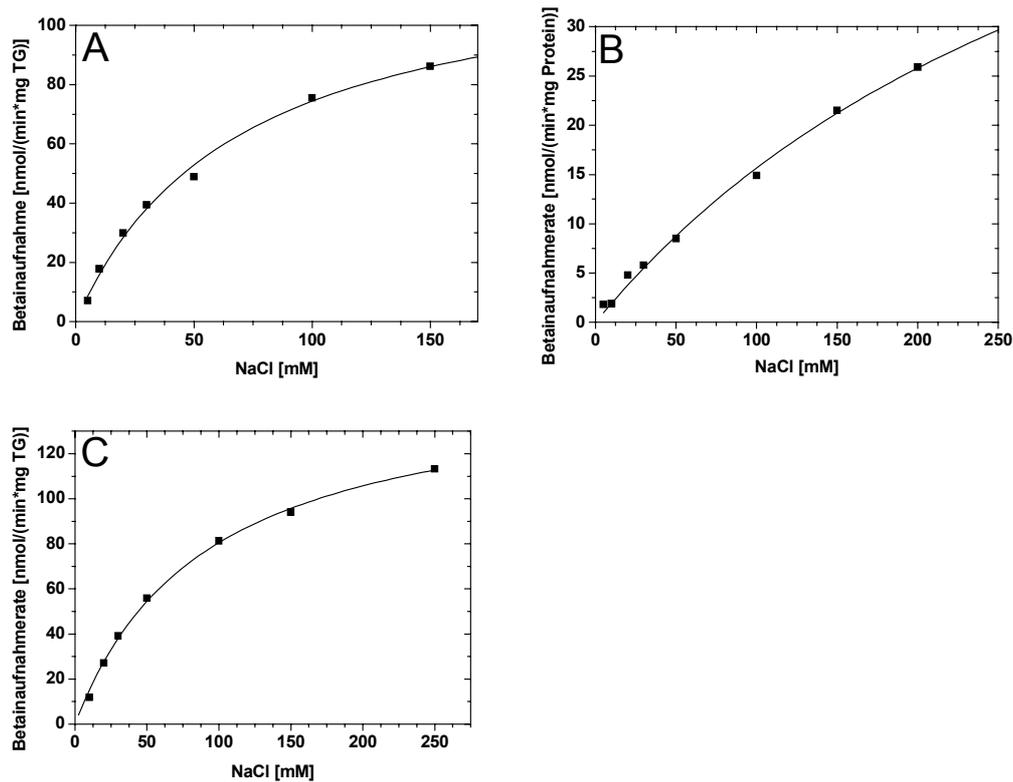


Abb. 21: Bestimmung der apparenten Na^+ -Affinität verschiedener BetP-Varianten im Stamm *C. glutamicum* DHPF anhand der Betainaufnahmerate unter verschiedenen externen Na^+ -Konzentrationen. Externer Puffer: 50 mM KPi pH 7,5, variierende NaCl-Konzentrationen. Die Osmolalität des externen Puffers von 1,2 osmol/kg wurde durch Zugabe von Sorbitol eingestellt. Die Aufnahmemessung wurde durch Zugabe von 250 μM ^{14}C -Glycinbetain gestartet. **A:** BetP C252T **B:** BetP C Δ 25 **C:** BetP E572D.

Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse der bisherigen Bestimmungen des apparenten K_m für Na^+ zusammen.

Tab. 8: Apparente Natriumaffinitäten verschiedener BetP Varianten in *E. coli* MKH13 und *C. glutamicum* DHPF.

BetP-Variante	<i>E. coli</i> MKH13		<i>C. glutamicum</i> DHPF	
	V_{max} [nmol/(min*mg TG)]	K_m [mM]	V_{max} [nmol/(min*mg TG)]	K_m [mM]
C252T	73,8 \pm 9	74,6 \pm 9	125 \pm 6	68 \pm 7
C252T C Δ 25	80,8 \pm 15	131,8 \pm 49	73 \pm 11	368 \pm 81
C252T 572AAA	30,6 \pm 3	30,7 \pm 9	n.b.	n.b.
C252T E572Q	70 \pm 7	48 \pm 12	n.b.	n.b.
C252T E572K	35,7 \pm 4	49,8 \pm 14	n.b.	n.b.
C252T E572D	n.b.	n.b.	153,8 \pm 4,4	91,1 \pm 6

n.b.: nicht bestimmt.

3.4.2 Expression von Plasmid-kodierten BetP C252T Varianten in den Stämmen *E. coli* MKH13 und *C. glutamicum* DHPF

Die in BetP C252T eingeführten Mutationen könnten sich auf den Expressionslevel und/oder auf die Einbaurrate der jeweiligen mutierten Carrier in die Cytoplasmamembran auswirken. Dies hätte zur Folge, dass unterschiedlich hohe Transportraten verschiedener BetP-Varianten auf unterschiedliche hohe Anteile an funktionell aktiven membranständigen Transportern und

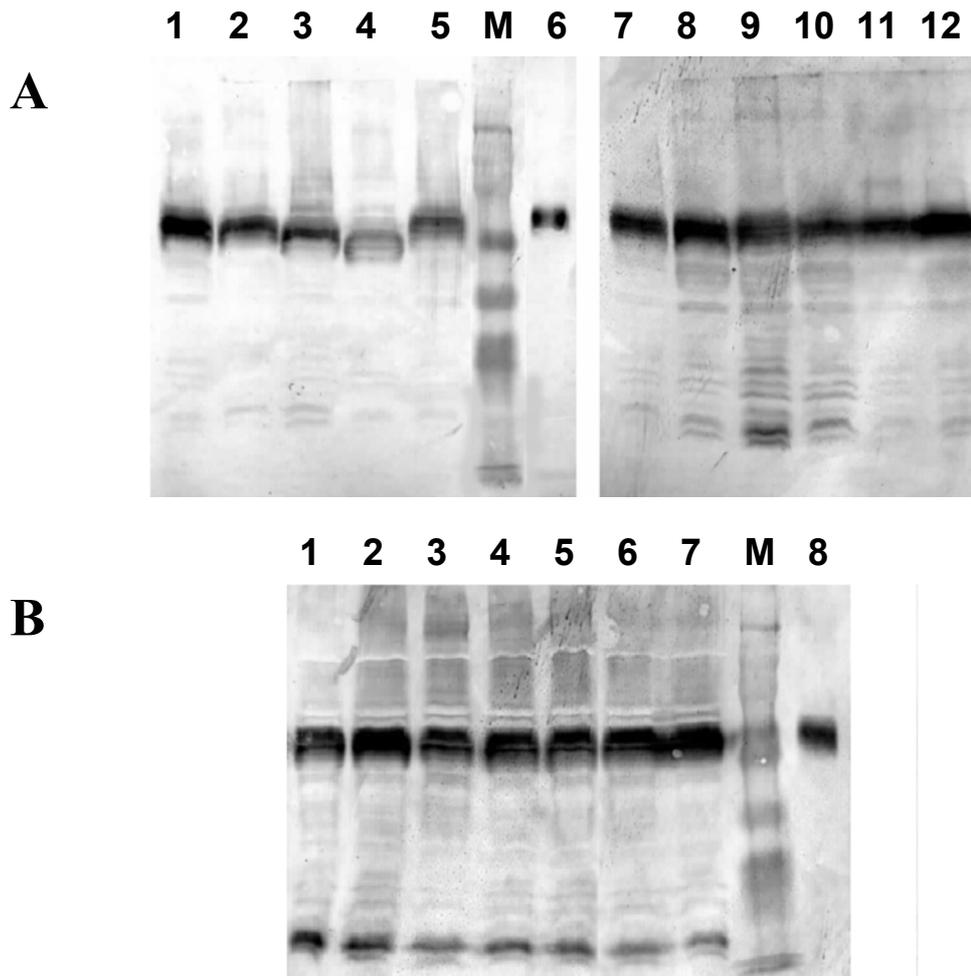


Abb. 22: Relative Expression von BetP C252T und seinen Derivaten in Zellen. Die Induktion der Proteinsynthese erfolgte analog zu den Transportmessungen in Zellen. Jeweils 50 μ g Gesamtprotein der Zellmembranpräparationen wurden über SDS-PAGE (12,5%) nach Laemmli getrennt. Der Nachweis der BetP-Derivate erfolgte mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern gegen BetP. **(A)** Folgende Proteine waren in der Zellmembran von *E. coli* MKH13 nachweisbar: C252T (1), C Δ 12 (2), C Δ 25 (3), C Δ 45 (4), 572AAA (5), gereinigtes C252T (Positivkontrolle) (6), E572Q (7), E572K (8), E572D (9), E577/585Q (10), E572C (11) und E572/577/585Q (12). **(B)** Folgende Proteine waren in der Zellmembran von *C. glutamicum* DHPF nachweisbar: C Δ 25 (1), C252T (2), E572C (3), E572D (4), E572K (5), 572AAA (6), E572/577/585Q (7) und gereinigtes C252T (Positivkontrolle) (8). Proteinmarker (M).

nicht auf geänderte Regulationsverhalten der Proteine zurückzuführen wären. Daher wurde der Einbau Plasmid-kodierter BetP-Varianten in die Cytoplasmamembran der zu Transportmessungen verwendeten Stämme *E. coli* MKH13 (Abb. 22A) und *C. glutamicum* DHPF (Abb. 22B) qualitativ überprüft. Die Induktion der BetP-Synthese erfolgte in analoger Weise wie für Transportmessungen mit den einzelnen BetP-Varianten. Jeweils gleiche Proteinmengen der präparierten Membranen wurden über SDS-PAGE getrennt und die BetP-Proteine durch einen BetP-Antikörper mit anschließendem kolorimetrischem Nachweis detektiert. Die in der Zellmembran nachweisbaren BetP-Mengen waren für alle Stämme ähnlich. Somit wurde davon ausgegangen, dass zumindest die Einbaurrate und -menge der einzelnen BetP-Varianten bei allen Mutanten vergleichbar war. Diese Untersuchung erlaubte allerdings keine Aussagen über die Anzahl der funktionell aktiven, membranständigen BetP-Varianten.

3.4.3 Osmoregulation von BetP-Varianten im Stamm *C. glutamicum* DHPF

Zur Untersuchung der Osmoregulation der Plasmid-kodierten BetP-Varianten BetP C252T, C Δ 25, 572AAA, E572/577/585Q, E572Q, E572K, E572D und E572C in einer nativen Membranumgebung, wurden die jeweiligen Transportraten in Abhängigkeit der externen Osmolalität im Stamm *C. glutamicum* DHPF bestimmt (Abb. 23). In diesem Stamm sind die Gene aller bekannten Transporter für kompatible Solute deletiert ($\Delta betP$, $\Delta proP$, $\Delta putP$, $\Delta ectP$, $\Delta lcoP$), so dass eine Aufnahme von osmoprotektiven Substanzen nur über Plasmid-kodierte Transporter erfolgen kann (Steger, 2002). Überraschenderweise waren alle BetP-Varianten, außer BetP C Δ 25, in *C. glutamicum*-Zellen in ihrer Aktivität osmotisch reguliert. Allerdings war im Vergleich zu BetP C252T der Schwellenwert der Aktivierbarkeit bei den einzelnen BetP-Varianten zu höheren Osmolalitäten verschoben. Weiterhin waren die maximalen spezifischen Carrieraktivitäten der einzelnen Proteine etwas geringer als die von BetP C252T. Diese Effekte waren am deutlichsten bei der BetP-Variante E572K zu beobachten, bei der die halbmaximale Aufnahmeaktivität bei einer externen Osmolalität von ca. 1,2 osmol/kg im Vergleich zu ca. 0,9 osmol/kg bei C252T bestimmt wurde. Die maximale Betainaufnahme rate war bei E572K dieser Mutante bei einer externen Osmolalität von 1,5 osmol/kg 43,3 nmol/(min*mg TG) und erreichte damit 63% der entsprechenden Aktivität von BetP C252T. Zusätzlich wurde die Aktivität der C-terminal verkürzten BetP-Variante C Δ 25 gemessen. Die Betainaufnahme rate von BetP C Δ 25 betrug nur 7-8 nmol/(min*mg TG) und erreichte damit nur ca. 12% der maximalen Aktivität von BetP C252 bei einer konstanten

externen Na^+ -Konzentration von 50 mM. Allerdings ist der apparente K_m für Na^+ mit 368 mM um den Faktor 5,4 höher im Vergleich zum K_m für Na^+ von BetP C252T. Die geringe Aktivität der C-terminal verkürzten BetP-Variante konnte somit auf die niedrige Affinität zum Cosubstrat zurückgeführt werden, da bei einer Erhöhung der externen Osmolalität mit NaCl statt Sorbitol Betainaufnahme von 28,3 nmol/(min*mg TG) bei einer externen Na^+ -Konzentration von 350 mM beobachtet werden konnten (Daten nicht gezeigt).

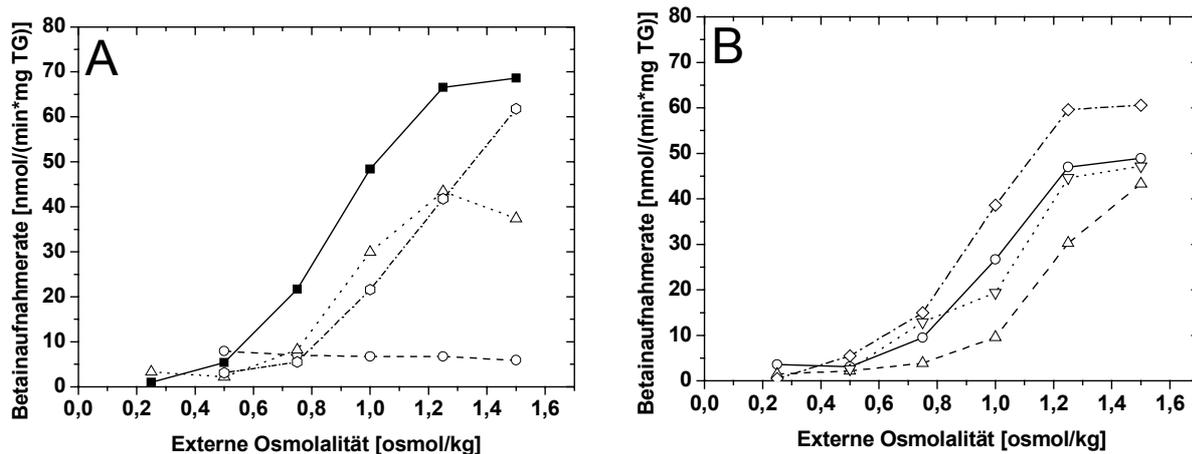


Abb. 23: Transportaktivität von BetP C252T und C-terminaler BetP-Varianten in Abhängigkeit der externen Osmolalität in *C. glutamicum* DHPF. Die Osmolalität des externen Puffers (50 mM KPi pH 7,5, 50 mM NaCl) wurde durch Sorbitol erhöht. Die Aufnahmemessung wurde durch Zugabe von 250 μM ^{14}C -Glycinbetain gestartet. Die Aufnahmeaktivitäten folgender DHPF/pBetP C252T-Stämme ist gezeigt: (A) C252T (Quadrate), CA25 (Kreise), 572AAA (aufrechte Dreiecke) und E572/577/585Q (Diamanten). (B) E572Q (Kreise), E572K (Dreiecke), E572C (umgedrehte Dreiecke) und E572D (Diamanten).

3.4.4 Osmoregulation verschiedener BetP-Varianten in Liposomen variierender Phospholipidzusammensetzungen

Untersuchungen zur Osmoregulation C-terminaler BetP-Varianten ergaben, dass die Sensitivität der Mutanten gegenüber der externen Osmolalität mit der Membranzusammensetzung variiert. In *E. coli*-Zellen war die Betainaufnahme der BetP-Varianten CA25, 572AAA, E572/577/585Q, E572Q, E572K, E572D und E572C unabhängig von der externen Osmolalität. Diese Mutationen führten zu einem Carrier, dessen Aufnahmeaktivität im Gegensatz zu BetP C252T nicht oder nur geringfügig durch sukzessive Erhöhung der externen Osmolalität gesteigert werden konnte. Im Gegensatz dazu war die katalytische Aktivität dieser BetP-Varianten mit Ausnahme der C-terminal verkürzten Variante CA25 in *C. glutamicum* osmotisch reguliert. Der Grund dieser Diskrepanz könnte in der

unterschiedlichen Phospholipidzusammensetzung der beiden Cytoplasmamembranen liegen. Während die Plasmamembran von *E. coli* zu 80% aus Phosphatidylethanolamin (PE), 15% Phosphatidylglycerol (PG) und 5% Cardiolipin (Diphosphatidylglycerol DPG) besteht (Prasad, 1996), ist die Zellmembran von *C. glutamicum* überwiegend aus PG zusammengesetzt (87%) (Hoischen und Krämer, 1990). Da PG im Gegensatz zu PE eine Nettoladung besitzt, ist die Membranoberfläche der *C. glutamicum*-Membran zum größten Teil negativ geladen. Diese negative Oberflächenladung der Membran könnte der Grund für das unterschiedliche osmoregulatorische Verhalten der einzelnen BetP-Varianten in *E. coli* und *C. glutamicum*-Zellen sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Osmolalitätsabhängige Aktivität der Mutanten BetP C252T, C Δ 25, 572AAA, E572K und E572C in Proteoliposomen unterschiedlicher Phospholipidzusammensetzungen bestimmt. Hierzu wurden die synthetischen Phospholipide 1,2-Dioleoyl-sn-Glycerol-3-Phosphat (DOPG), 1,2-Dioleoyl-sn-Glycerol-3-Phosphoethanolamin (DOPE) und 1,2-Dioleoyl-sn-Glycerol-3-Phosphocholin (DOPC) verwendet, die sich nur in den Kopfgruppen voneinander unterscheiden. Die Variation der Phospholipide erfolgte durch Fusion von Proteoliposomen bestehend aus *E. coli*-Lipiden mit Liposomen bestehend aus DOPG oder aus DOPC/DOPE (1:1 w/w). Zunächst wurde das osmoregulatorische Verhalten der Cystein-freie BetP-Variante C252T in Proteoliposomen mit 33, 50, 66 und 83% (w/w) synthetischen Phospholipiden untersucht (Abb. 24). Der Carrier war in allen Präparationen in seiner Aktivität osmotisch reguliert, allerdings war das Ausmaß der Aktivierung in DOPC/DOPE-haltigen Proteoliposomen von der Gesamtmenge an synthetischen Phospholipiden abhängig (Abb. 24A). Im Gegensatz dazu wurde die Aktivierbarkeit des Transporters mit zunehmenden Anteil an DOPG unter Abnahme der spezifischen Aktivität zu höheren Osmolalitäten hin verschoben (Abb. 24B). Die jeweiligen Aktivierungsfaktoren der Betainaufnahme durch BetP C252T in Proteoliposomen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung sind in Abbildung 25 zusammengefasst. Zur Kontrolle wurde BetP C252T direkt in vorgeformte PG-haltige Liposomen rekonstituiert (Abb. 24C). Wie bereits in den Fusionsexperimenten beobachtet werden konnte (Abb. 24B), war das osmotische Aktivierungsprofil mit Zunahme des PG-Gehalts unter Abnahme der spezifischen Aktivität zu höheren Osmolalitäten verschoben.

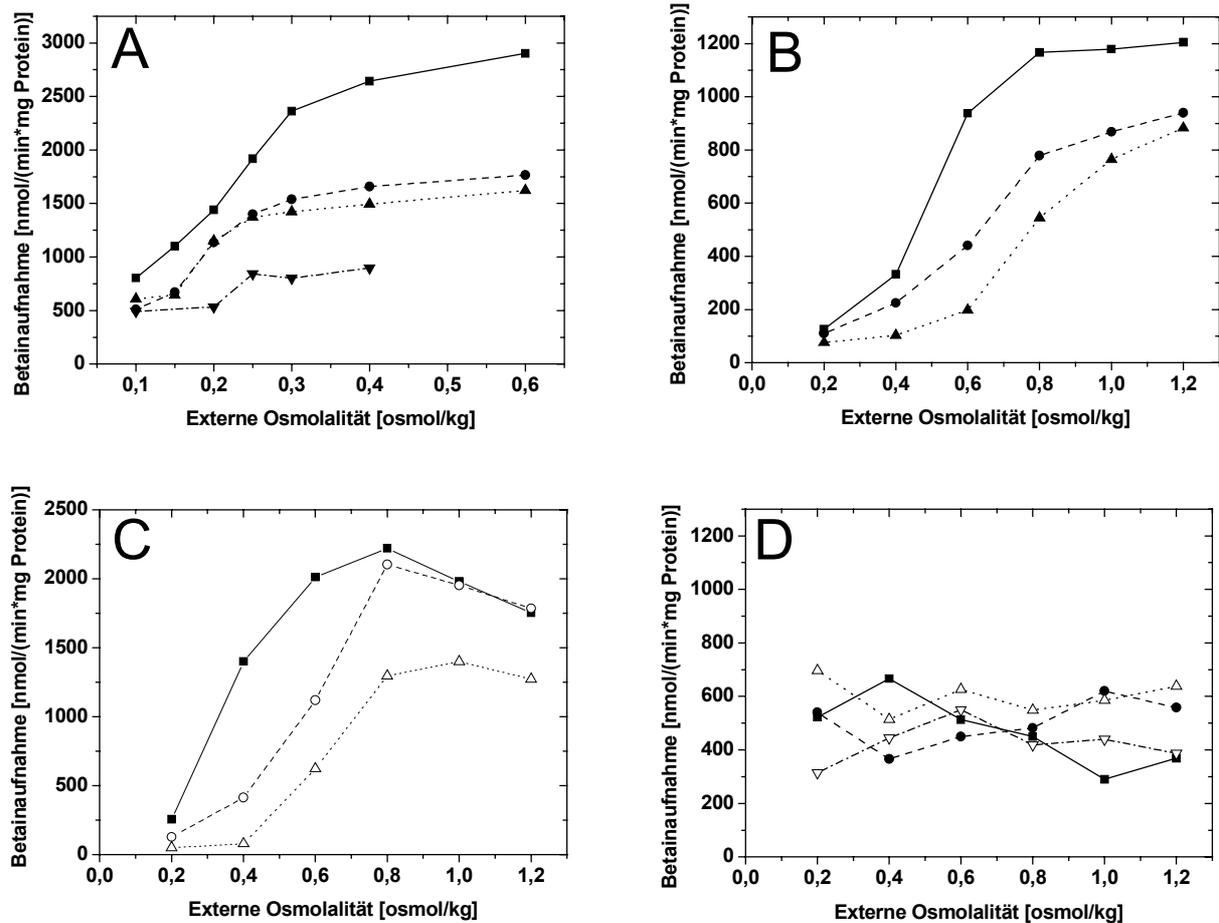


Abb. 24: Aktivitätsregulation von BetP C252T und BetP CA25 in Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden mit variierendem Gehalt an synthetischen Phospholipiden. (A) Osmoregulation von BetP C252T in Proteoliposomen mit 33% (Quadrate), 50% (Kreise), 66% (Dreiecke) oder 83% (umgekehrte Dreiecke) an DOPC/DOPE (w/w). (B) Osmoregulation von BetP C252T in Proteoliposomen mit 33% (Quadrate), 50% (Kreise) oder 66% (Dreiecke) an DOPG (w/w). Der Gehalt an synthetischen Phospholipiden in A und B wurde durch Fusion von Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden mit Liposomen aus DOPG oder DOPC/DOPE (Molverhältnis 1:1) variiert. (C) Osmoregulation von BetP C252T nach Rekonstitution in Liposomen aus *E. coli*-Lipiden mit 0% (Quadrate), 30% (offene Kreise) oder 60% (offene Dreiecke) an DOPG (w/w). (D) Osmoregulation von BetP CA25 in Proteoliposomen mit 50% DOPC/DOPE (Quadrate) oder 50% DOPG (Kreise) und nach Rekonstitution in Liposomen aus *E. coli*-Lipiden mit 30% (offene Dreiecke) oder 60% (umgedrehte offene Dreiecke) an DOPG (w/w).

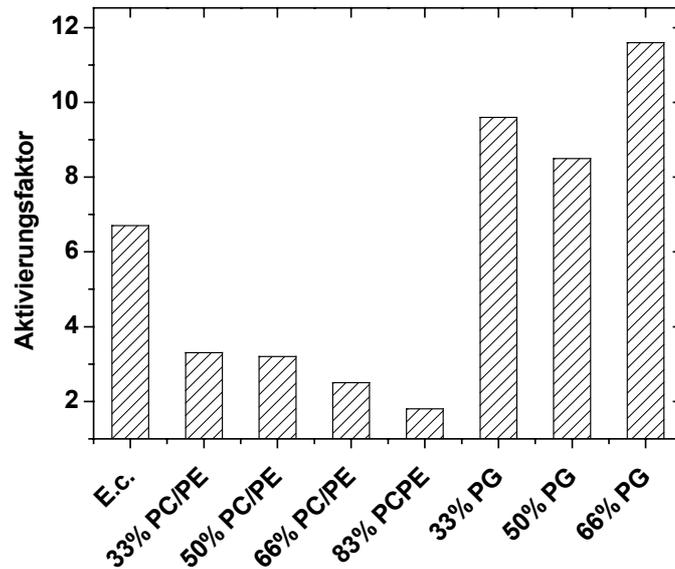


Abb. 25: Aktivierungsfaktoren von BetP C252T in Proteoliposomen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung. Die Erhöhung der Betainaufnahmeraten aus Abb. 24A in Abhängigkeit von der externen Osmolalität (0,1-0,4 osmol/kg) in DOPC/DOPE-dotierten Proteoliposomen und die maximale Betainaufnahmerate aus Abb. 24B in DOPG-dotierten Proteoliposomen ist gezeigt. E.c.: BetP C252T rekonstituiert in Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Variation der Phospholipidzusammensetzung durch Fusion von Proteoliposomen mit entsprechenden Liposomen geeignet war, den Einfluss verschiedener Kopfgruppen auf die osmotische Aktivierbarkeit von BetP zu untersuchen. Da der Prozess der Liposomenfusion durch Frieren/Tauen eher undefiniert ist und unter Umständen Einfluss auf die Transportaktivität des untersuchten Proteins nehmen könnte, wurde als weitere Kontrolle das osmotische Aktivierungsprofil der C-terminal verkürzten Mutante C Δ 25 in PG-haltigen Liposomen untersucht (Abb. 24D) Die hierzu verwendeten Proteoliposomen wurden analog zu den Experimenten mit der BetP-Variante C252T hergestellt (vergl. hierzu Abb. 24B und C). Wie in der Abbildung 24D ersichtlich, wurde die deregulierte Transportaktivität der C-terminalen BetP-Variante C Δ 25 nicht von der Natur der umgebenden Phospholipidmembran beeinflusst. Daher scheint weder der Prozess des Fusionierens, noch die Art der Phospholipide Einfluss auf die Insensitivität von BetP C Δ 25 gegenüber der externen Osmolalität zu nehmen. Auf Grund dieser Erkenntnisse wurde der Einfluss der Kopfgruppen synthetischer Phospholipide auf die Osmoregulation der C-terminalen Mutanten 572AAA, E572K und E572C untersucht (Abb. 26). Es wurde eine

Endkonzentration an synthetischen Phospholipiden von 33% (w/w) gewählt, da BetP C252T in dieser Lipidmischung ein zu *E. coli*-Zellen vergleichbares osmotisches Aktivierungsprofil aufwies. Die prozentualen Anteile einzelner Phospholipide in DOPC/DOPE-dotierten Proteoliposomen betragen etwa 70% PE, 16,5% PC und 13,5% PG und in DOPG-dotierten Proteoliposomen 54% PE und 46% PG. Da Phosphatidylethanolamin alleine keine Lipiddoppelschicht ausbilden kann, wurde es mit PC (kann Lipiddoppelschicht ausbilden) im equimolaren Verhältnis zugegeben, um die Endkonzentration an synthetischen Phospholipiden in beiden Ansätzen anzugleichen.

Während für BetP C252T eine Aktivitätssteigerung in Proteoliposomen bestehend aus 33% DOPC/DOPE von 0,1 bis 0,6 osmol/kg um den Faktor 3,4 bestimmt werden konnte, erhöhten sich die Transportraten der Mutanten 572AAA, E572K und E572C im Osmolalitätsbereich von 0,15 bis 0,6 osmol/kg um die Faktoren 1,2, 1,6 und 1,9. Die maximalen spezifischen Aktivitäten fielen bei allen drei untersuchten Proteinen im Vergleich zu BetP C252T deutlich geringer aus. Das osmotische Aktivierungsprofil entsprach dem aus *E. coli*-Zellen bekannten Regulationsmuster, d.h., die Aktivitäten von BetP 572AAA, E572K und E572C wurden nur geringfügig durch Erhöhung der externen Osmolalität gesteigert.

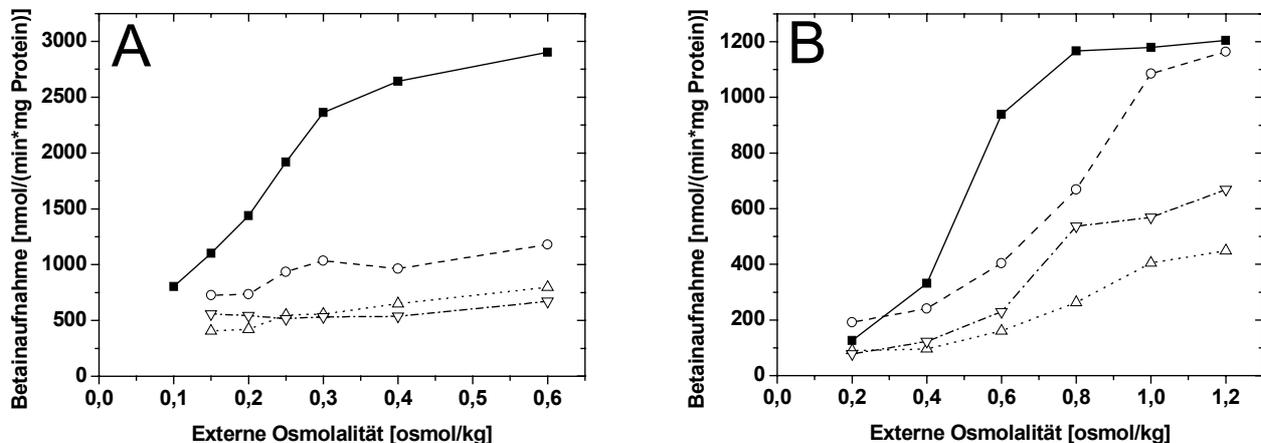


Abb. 26: Osmoregulation von BetP C252T und C-terminaler Derivate in Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden mit variierendem Gehalt an synthetischen Phospholipiden. (A) Betainaufnahme in Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden mit 33% DOPC/DOPE (w/w). BetP C252T (Quadrat), E572K (Kreise), E572C (Dreiecke) und 572AAA (umgedrehte Dreiecke). **(B)** Betainaufnahme in Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden mit 33% DOPG (w/w). BetP C252T (Quadrat), E572K (Kreise), E572C (Dreiecke) und 572AAA (umgedrehte Dreiecke). Der Gehalt an synthetischen Phospholipiden in A und B wurde durch Fusion von Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden mit Liposomen aus DOPG oder DOPC/DOPE (1:1) variiert.

In einem weiteren Experiment wurden analog zum Versuch in Abb. 26A die osmoregulatorischen Kapazitäten der drei BetP-Varianten in DOPG-haltigen Proteoliposomen

bestimmt (Abb. 26B). Während für BetP C252T eine Aktivitätssteigerung in Proteoliposomen bestehend aus 33% DOPG von 0,2 bis 1,2 osmol/kg um den Faktor 9,5 bestimmt werden konnte, erhöhten sich die Transportraten der BetP-Derivate 572AAA, E572K und E572C im gleichen Osmolalitätsbereich um die Faktoren 5,4, 6 und 5. Zusätzlich war die jeweilige halbmaximale Betainaufnahme zu höheren Osmolalitäten verschoben. Die im Vergleich zu *E. coli*-Zellen und Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden unterschiedliche Aktivitätsregulation dieser BetP-Varianten in *C. glutamicum*-Zellen konnte hier durch Variation der Lipidzusammensetzungen im Proteoliposomensystem nachvollzogen werden. Da der BetP-Aktivierung K^+ -spezifisch ist, könnte die in Abb. 26A beobachtete geringfügige Aktivierung von BetP E572K auf einen Verlust der Kaliumwahrnehmung zurückzuführen sein. Tatsächlich war keine Aktivierung der katalytischen Aktivität durch eine Erhöhung der K^+ -Konzentration bei BetP E572K im Vergleich zum Cystein-freien Protein zu beobachten (Abb. 27).

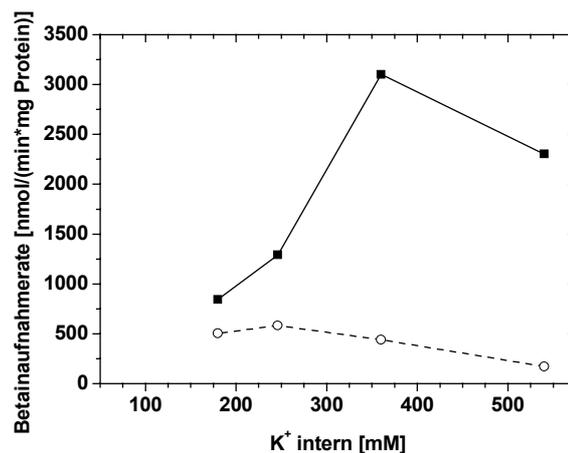


Abb. 27: Aktivitätsregulation von BetP C252T und E572K in DOPC/DOPE (33% w/w) dotierten Proteoliposomen in Abhängigkeit der intraliposomalen K^+ -Konzentration. Der interne Puffer enthielt 100, 136, 200 oder 300 mM KP_i , pH 7,5. Dies entsprach internen K^+ -Konzentrationen von 180, 246, 360 und 540 mM. Der externe Puffer enthielt 20 mM NaP_i , pH 7,5, 25 mM NaCl (100 mosmol/kg). Isoosmolalität zwischen internem und externem Puffer wurde durch Zugabe von Sorbitol zum externen Puffer eingestellt. BetP C252T (Quadrate), E572K (offene Kreise).

Die Durchführung des methodisch identischen Experiments in Proteoliposomen mit einem Gesamtgehalt an PG von 46% ließ keine eindeutige Interpretation zu. Der Schwellenwert der BetP-Aktivierung ist mit Zunahme des PG-Gehalts der Membran zu höheren Osmolalitäten verschoben. Die interne K^+ -Konzentration erhöht sich in diesen Proteoliposomen durch

Wasserausstrom unter hyperosmotischen Bedingungen rechnerisch auf ca. 900 mM (vergl. Abb. 26B). Die Präparation von Proteoliposomen mit so hohen internen Ionenkonzentrationen durch die in dieser Arbeit verwendete Methode (Extrusion) führte allerdings zu instabilen Vesikeln, so dass keine zweifelsfreie Korrelation zwischen Steigerung der BetP-Aktivität und Erhöhung der internen K^+ -Konzentration in PG-dotierten Proteoliposomen beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Somit bleibt die Frage offen, auf welche Weise die Lipidumgebung die K^+ -Sensitivität und damit die osmotisch regulierte Aktivität von BetP beeinflusst.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden die osmoregulatorischen und osmosensorischen Eigenschaften des sekundären Na⁺/Betain Symporters BetP aus *Corynebacterium glutamicum* untersucht. Hierzu wurde der Carrier mit Hilfe eines N-terminalen StreptagII gereinigt und in Liposomen funktionell rekonstituiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von BetP spezifisch für Kaliumionen ist. Mit Hilfe von immunologischen und proteolytischen Studien wurde die unidirektionale Rekonstitution des Carriers in die Liposomenmembran nachgewiesen. Durch funktionelle Rekonstitution rekombinanter BetP-Varianten in Liposomen verschiedener Phospholipidzusammensetzungen konnte gezeigt werden, dass bestimmte Aminosäuren innerhalb der C-terminalen Domäne an der osmotisch regulierten Betainaufnahme und an der K⁺-abhängigen Aktivierung des Proteins beteiligt sind. Diese Kaliumionen-spezifische Aktivierung des Carriers variiert mit der Art an Phospholipiden innerhalb der Liposomenmembran. Die *in vitro* erhaltenen Daten zur Chemosensorik des Proteins wurden durch physiologische Studien zur Osmoregulation des Transporters untermauert.

Die Cystein-freie BetP-Variante C252T ist in ihren katalytischen, osmoregulatorischen und chemosensorischen Eigenschaften identisch zum Wildtyp

Die Studien in dieser Arbeit wurden an einer Cystein-freien BetP-Variante durchgeführt, bei der Cystein an Position 252 in der fünften Transmembranhelix gegen ein Threonin ausgetauscht wurde. Diese BetP-Variante bietet den Vorteil in zukünftigen Experimenten die Proteindynamik von BetP fluoreszenzspektroskopisch zu untersuchen. In dieser Arbeit waren alle untersuchten Transportervarianten Derivate der Cystein-freien BetP-Form, daher musste zunächst überprüft werden, ob dieses Protein ein geeignetes Objekt zum Studium der osmoregulatorischen Eigenschaft von BetP war.

In mindestens 50% aller bekannten Transporter der BCCT-Familie liegt an dieser Position ein Threonin vor (Rübenhagen, Dissertation 2001). Da Cystein und Threonin keine bekannten Helixbrecher sind, hatte die Wahl eines Threonins an dieser Position vermutlich keine Auswirkung auf die Struktur des Carriers. Die Charakterisierung von BetP C252T in Proteoliposomen und in ganzen Zellen zeigte, dass die kinetischen Eigenschaften von C252T und BetP in den jeweiligen Systemen vergleichbar waren. Die osmotisch regulierten Betainaufnahmearten des Wildtyps und der Variante BetP C252T unter hyperosmotischen Bedingungen in ganzen Zellen waren identisch. Ebenso wurde die BetP C252T-Aktivität in Proteoliposomen in einer zum Wildtyp vergleichbaren Weise stimuliert (vergl. Abb. 4). Somit ist die Cystein-freie BetP-Variante bezüglich ihrer kinetischen, chemosensorischen und

osmoregulatorischen Eigenschaften *in vivo* und *in vitro* nahezu identisch zum Wildtyp und daher für die in dieser Arbeit untersuchten Fragestellungen ein geeignetes Untersuchungsobjekt. Die Konstruktion einer Cystein-freien Wildtypvariante eines Osmosensors ist auch bei dem zur MFS-Familie gehörigen sekundären Transporter ProP aus *E. coli* beschrieben worden. In dieser Variante waren ebenfalls keine Auswirkungen auf die katalytische Aktivität und osmotische Regulation des Proteins zu beobachten (Culham *et al.*, 2003a).

Die Aktivierung von BetP ist spezifisch für K⁺

Die Aktivierung osmosensorischer Transportsysteme kann durch eine osmotisch bedingte Erhöhung der intrazellulären Ionenkonzentration erfolgen. So wird der sekundäre Transporter ProP aus *E. coli* ebenso wie der ABC-Transporter OpuA aus *L. lactis* unter anderem durch eine Erhöhung intrazellulärer Kationen aktiviert (Racher *et al.*, 2001; Culham *et al.*, 2003b; van der Heide *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu diesen Transportern scheint die Aktivierung von BetP K⁺-spezifisch zu sein. Im proteoliposomalen System waren Cs⁺ und Rb⁺ im Gegensatz zu Cholin und NH₄⁺ ebenfalls in der Lage, die BetP-Aktivität zu stimulieren. Auf Grund von energetischen Problemen im Proteoliposomensystem konnte eine mögliche Stimulation des Carriers durch Na⁺ oder Li⁺ nicht untersucht werden (Rübenhagen *et al.*, 2001). Zur Untersuchung einer möglichen aktivitätsstimulierenden Wirkung eines Soluts, muss dessen intraliposomale Konzentration variiert werden. Jedoch beeinflusst die Variation interner Na⁺-Konzentrationen das elektrochemische Na⁺-Potenzial, das die treibende Kraft des BetP-vermittelten Betainimports in Proteoliposomen darstellt. Somit musste in dieser Arbeit ein experimentelles System entwickelt werden, das die Untersuchung einer möglichen Na⁺-Stimulation der BetP-Aktivität erlaubt. Erst eine mögliche Diskriminierung von BetP zwischen K⁺ und Na⁺ als chemischen Stimulus der Transportaktivität erlaubt die Interpretation, dass BetP, physiologisch gesehen, ein K⁺-Sensor ist.

Der Vergleich der BetP-Aktivität bei Erhöhung der intraliposomalen Na⁺- oder K⁺-Konzentration unter identischen energetischen Voraussetzungen ergab, dass die Betainaufnahme durch Na⁺-Stimulation im Vergleich zur entsprechenden K⁺-Stimulation vernachlässigbar war. Darüber hinaus konnte die beobachtete geringe BetP-Aktivierung durch Erhöhung der internen Na⁺-Konzentration bis zu 120 mM nur bei intraliposomalen K⁺-Konzentrationen von weniger als 100 mM beobachtet werden. Da die Kaliumkonzentrationen allerdings im allgemeinen höher als 100 mM sind, wäre eine putative Na⁺-Stimulierung von BetP physiologisch irrelevant, da sie durch den K⁺-Stimulus überdeckt werden würde. Darüber hinaus liegt die Na⁺-Konzentration in *C. glutamicum*-Zellen etwa bei 10 mM

(Farwick *et al.*, 1995) und ist somit weitaus geringer als die interne K^+ -Konzentration. Nach einem hyperosmotischen Schock erhöhen sich die Konzentrationen beider Kationen, bedingt durch den osmotisch induzierten Wasserausstrom aus dem Cytoplasma, wobei sich der Kaliumgehalt durch Aktivierung von K^+ -Aufnahmesystemen zusätzlich steigert. Da K^+ eine starke Aktivierung von BetP hervorruft, ist die Stimulation der BetP-vermittelten Betainaufnahme durch Na^+ marginal. Daher wird die BetP-Aktivität nicht durch Na^+ reguliert. Dass sich die interne K^+ -Konzentration in *C. glutamicum* nach einem hyperosmotischen Schock von 0,9 auf 2,4 osmol/kg durch Akkumulation von 450 auf 800 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{TG})$ verdoppelt, konnte durch Wolf *et al.*, 2003 gezeigt werden. Darüber hinaus wird die K^+ -Akkumulation als erste schnelle Antwort von Bakterien auf einen osmotischen *upshift* beschrieben (Wood, 1999). Aus diesen Gründen könnte die Aktivierung von BetP auch *in vivo* von Kaliumionen abhängig sein. Somit wäre BetP physiologisch betrachtet ein K^+ -Sensor.

Der Einbau von BetP in die Liposomenmembran erfolgt unidirektional

Frühere biochemische und immunologische Studien zur Orientierung von BetP in intakten Zellen zeigten eine Übereinstimmung mit der computergestützten Vorhersage der BetP-Topologie von BetP, d. h., dass die N- und die C-terminale Extension jeweils zur cytoplasmatischen Seite der Membran orientiert ist (Rübenhagen *et al.*, 2001). Die Orientierung des Carriers in Proteoliposomen war hingegen nicht bekannt. Da die oben beschriebene Diskriminierung von BetP zwischen Na^+ und K^+ auf die Existenz einer spezifischen regulatorischen Bindestelle für Kaliumionen hindeutete, musste zur Identifizierung einer solchen putativen Kaliumbindestelle die Topologie des Transporters innerhalb der Proteoliposomenmembran bestimmt werden.

Während der Einbau von Proteinen in die Zellmembran unidirektional erfolgt, ist die Orientierung von Membranproteinen innerhalb der Liposomenmembran maßgeblich abhängig von der Rekonstitutionsmethode. So entscheidet beispielsweise die Wahl des verwendeten Detergenz bei der Rekonstitution von LacS, dem Lactose Transporter aus *Streptococcus thermophilus*, oder von DtpT, dem Di-Tripeptid Transporter aus *Lactococcus lactis* darüber, ob das Protein unidirektional oder zufällig orientiert in die Lipiddoppelschicht integriert wird (Knol *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 1999). Weiterhin können elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Protein- und Membranoberfläche über die Orientierung des Proteins in der Proteoliposomenmembran entscheiden (Steverding *et al.*, 1989). In dieser Arbeit wurde über die Zugänglichkeit der C-terminalen Extension für spezifische Antikörper und über die

Zugänglichkeit der N-terminalen Extension für spezifische Aminopeptidasen die unidirektionale Orientierung von BetP innerhalb der Liposomenmembran nachgewiesen. Die Beobachtung, dass die C-terminale Extension nur durch in Proteoliposomen eingeschlossene Antikörper detektiert werden konnte, spricht dafür, dass dieser Proteinbereich intraliposomal orientiert war. Weiterhin war die N-terminale Extension in intakten Proteoliposomen nicht für einen spezifischen Verdau durch Exopeptidasen zugänglich. Erst nach Solubilisierung der Vesikel konnte die N-terminale Extension proteolytisch angegriffen werden. Zusammengefasst bestätigen diese Beobachtungen eine *right-side-out*-Orientierung von BetP in Proteoliposomen. Dies entspricht der Topologie in *E. coli*-Zellen und deckt sich mit der Topologievorhersage in *C. glutamicum* (Peter *et al.*, 1998b; Rübénhagen *et al.*, 2001). Die in Anlehnung nach Rigaud *et al.*, 1995 verwendete Rekonstitutionsmethode war somit zum unidirektionalen Einbau von BetP und von BetP-Varianten in Liposomen geeignet. Damit konnte gezeigt werden, dass die Wahrnehmung von K^+ als osmotischen Stimulus sowohl in Zellen als auch in Proteoliposomen durch intern lokalisierte Proteinbereiche erfolgen muss.

Die C-terminale Extension ist an der osmotisch regulierten Aktivität von BetP beteiligt

Als unmittelbare Folge eines hyperosmotischen Schocks kommt es zu einem raschen Wasserausfluss aus dem Cytoplasma. Abhängig von der Stärke des hyperosmotischen Schocks können die Zellen plasmolysieren. Die Reduktion des Zellvolumens bewirkt eine Erhöhung der intrazellulären Solutkonzentration. Hierbei ist die Erhöhung des intrazellulären K^+ -Gehalts der chemische Stimulus, der von BetP spezifisch detektiert wird und zur Aktivierung des Carriers führt. Mit der in dieser Arbeit nachgewiesenen unidirektionalen Orientierung von BetP innerhalb der Liposomenmembran war die Voraussetzung zur Identifizierung von Proteinbereichen gegeben, die unmittelbar an der Wahrnehmung von K^+ -Erhöhungen beteiligt sein könnten.

Erste Hinweise darauf, welche Proteindomänen in der osmotisch regulierten BetP-Aktivität involviert sein könnten, wurden durch die Aktivität von C-terminal verkürzten BetP-Varianten in *C. glutamicum* erhalten (Peter *et al.*, 1998b). Die schrittweise Verkürzung dieses Proteinbereichs führte zu BetP-Varianten, die unabhängig von der externen Osmolalität permanent aktiv waren. Diese Mutanten waren nicht in der Lage, die katalytische Aktivität in Abhängigkeit der osmotischen Bedingungen zu regulieren und zeigten somit unter osmotischem Stress ein dereguliertes Aktivitätsprofil. Um eine mögliche Beteiligung der C-terminalen Extension an der Wahrnehmung von K^+ als osmotischen Stimulus nachzuweisen, wurden C-terminal verkürzte BetP-Varianten in Proteoliposomen rekonstituiert und

hinsichtlich ihrer chemosensorischen Eigenschaften untersucht. Vor der Rekonstitution der Proteine wurde die Osmoregulation der Plasmid-kodierten C-terminal verkürzten BetP-Varianten in *E. coli*-Zellen überprüft. Dies hatte den Vorteil, dass das in Zellen beobachtete osmotische Aktivitätsprofil direkt mit der osmotisch regulierten Aktivität des Proteins in Proteoliposomen verglichen werden konnte. Darüber hinaus konnten über Western-Blot-Analysen eventuelle Unterschiede in der relativen Expression der BetP-Varianten mit der *in vivo*-Aktivität der Carrier-Variante korreliert werden.

Die funktionale Charakterisierung C-terminal verkürzter BetP-Varianten in *E. coli*-Zellen und in Liposomen aus *E. coli*-Lipiden ergab, dass eine schrittweise Verkürzung der C-terminalen Domäne um 12, 25 oder 45 Aminosäuren (Gesamtgröße 55 Aminosäuren) mit einer Abnahme der osmotisch regulierten katalytischen Aktivität von BetP einhergeht. Der Verlust der endständigen 12 C-terminalen Aminosäuren führte zu einem Aktivitätsprofil, das als teilweise osmotisch reguliert interpretiert wurde, da diese BetP-Variante bereits bei geringen externen Osmolalitäten eine deutlich höhere Aktivität im Vergleich zu BetP C252T aufwies. Mit zunehmender Verkürzung der Extension um 25 und 45 Aminosäuren wurde eine nahezu konstante Transportrate unabhängig von der externen Osmolalität bestimmt. Diese BetP-Varianten hatten die Fähigkeit zur Regulation der katalytischen Aktivität unter hyperosmotischen Bedingungen verloren und zeigten somit ein osmotisch dereguliertes Aktivitätsprofil. Interessanterweise waren die Transportraten von BetP C Δ 25 und BetP C Δ 45 sowohl in Zellen als auch in Proteoliposomen im Vergleich zu BetP C252T deutlich vermindert. Durch die Bestimmung der kinetischen Parameter konnte gezeigt werden, dass die geringere spezifische Transportaktivität auf eine verminderte Affinität der verkürzten BetP-Varianten zum Cosubstrat Na⁺ zurückzuführen war. Somit könnte zur Cosubstratbindung eine durch die gesamte C-terminale Domäne hervorgerufene Konformation des Carriers notwendig sein. Eine direkte Beteiligung an der Na⁺-Bindung ist auf Grund der cytoplasmatischen Lokalisierung der C-terminalen Extension auszuschließen.

Der Verlust der osmoregulatorischen Eigenschaft der C-terminal verkürzten BetP-Varianten wies auf eine mögliche Beteiligung dieses Proteinbereiches an der Wahrnehmung des osmotischen Stimulus K⁺ hin. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde mit Hilfe des Proteoliposomensystems, das im Gegensatz zu ganzen Zellen die definierte Variation der internen K⁺-Konzentrationen erlaubt, die Abhängigkeit der Aktivität der BetP-Varianten von der internen Kaliumionenkonzentration bestimmt. Tatsächlich korrelierte die Aktivität von BetP C Δ 12 immer noch mit einer Erhöhung der internen Konzentration des Kations, während die Verkürzungen um 25 bzw. 45 Aminosäuren zu K⁺-insensitiven Varianten führten und

konstante Betainaufnahmeraten aufwiesen. Dies deutete auf eine direkte Beteiligung insbesondere der C-terminalen Aminosäuren zwischen den Positionen 571 und 583 (Gesamtgröße 595 Aminosäuren) in der K^+ -abhängigen Aktivierung von BetP hin.

Mit der hier gezeigten Rolle der C-terminalen Extension von BetP bei der Wahrnehmung und Verarbeitung von osmotischem Stress konnte erstmalig eine direkte Korrelation zwischen einem osmotischen Stimulus (Variation der internen Kaliumionenkonzentration) und einem für die Aktivitätsregulation essentiellen Proteinbereich eines osmotisch regulierten Membrantransporters hergestellt werden. Auf Grund der erhaltenen Daten muss für die Aktivierung von BetP eine spezifische Protein/ K^+ -Wechselwirkung gefordert werden. Somit sind folgende molekulare Mechanismen der K^+ -abhängigen Aktivierung von BetP denkbar: (a) K^+ wird nicht durch die C-terminale Extension, sondern durch interne Schleifen und/oder durch die N-terminale Domäne gebunden. Die C-terminale Extension ist an der Weiterleitung des Signals an die katalytische Domäne von BetP beteiligt. In diesem Fall wäre die C-terminale Extension indirekt an der Chemosensorik und direkt an der Signaltransduktion beteiligt. (b) K^+ wird ausschließlich durch Aminosäuren der C-terminalen Extension oder zusätzlich über interne Schleifen und/oder N-terminale Extension koordiniert. Dadurch ändert sich die Konformation dieser Proteindomäne und BetP wird katalytisch aktiv. Die C-terminale Extension wäre somit sowohl direkt an der Chemosensorik, als auch direkt an der Signaltransduktion beteiligt.

Glutamat 572 innerhalb der C-terminalen Extension ist direkt an der Chemosensorik von BetP in Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden beteiligt

Zur Unterscheidung, ob mit den C-terminalen Verkürzungen Aminosäuren entfernt wurden, die direkt an der spezifischen Erkennung von Kaliumionen beteiligt sind oder ob die C-terminale Extension unabhängig von einer Kaliumwahrnehmung nur zur Aktivitätsregulation des Carriers benötigt wird, wurden die letzten 25 Aminosäuren der C-terminalen Extension durch ortsspezifische Mutagenese ausgetauscht. Hierbei wurden zum einen jeweils drei Aminosäuren durch drei Alanine ersetzt, zum anderen wurden alle negativ geladenen Aminosäurereste als mögliche K^+ -koordinierende Aminosäurereste einzeln oder mehrfach gegen Glutamine ausgetauscht. Sollten durch diese Manipulation Aminosäuren betroffen sein, die die chemosensorische Eigenschaft des Carriers definieren, so wäre eine analog zu BetP CA25 in ihrer osmotischen Aktivität deregulierte Variante zu erwarten gewesen. Sollte der Austausch einzelner Aminosäuren keine Auswirkungen auf die osmotische Aktivierbarkeit des Transporters haben, wären die letzten 24 Aminosäuren der C-terminalen

Extension nur an der katalytischen Aktivität und/oder Signaltransduktion, nicht aber an der Chemosensorik (direkte Interaktion mit K^+) von BetP beteiligt.

Bezüglich der Synthese und des Membraneinbaus, sowie bezüglich der Effizienz der Reinigung waren die untersuchten BetP-Varianten identisch zu BetP C252T. Alle untersuchten Proteinformen waren sowohl in Zellen, als auch im rekonstituierten System katalytisch aktiv. Allerdings ergaben sich im Vergleich zu BetP C252T Unterschiede hinsichtlich der Osmoregulation einzelner Plasmid-kodierter Transportervarianten in *E. coli* (Abb. 12-15). Interessanterweise führte der Austausch einzelner C-terminaler Aminosäurereste generell -mit Ausnahme der Tripelmutante 590AAA- zu BetP-Varianten, die sich durch eine im Vergleich zu BetP C252T verringerte Aktivierbarkeit auszeichneten. D.h., die Erhöhung der Betaintransportrate in Abhängigkeit der externen Osmolalität war im Vergleich zu BetP C252T geringer. Eine BetP-Variante, die ein dereguliertes osmotisches Aktivitätsprofil, also bereits eine bei niedrigen externen Osmolalitäten zur maximalen Betainaufnahmerate von BetP C252T vergleichbare Aktivität aufwies, konnte nicht identifiziert werden. Somit waren die durch den Mutageneseansatz eingeführten Manipulationen innerhalb der C-terminalen Extension in der Modulation der osmotischen Carrieraktivität weniger ausgeprägt als die Deletion der endständigen 25 C-terminalen Aminosäuren. Trotzdem konnten auf Grund der geringen Aktivierungsfaktoren der BetP-Derivate 572AAA, E572/577/585Q und E572Q in *E. coli* BetP-Varianten identifiziert werden, die ein im Vergleich zu BetP C252T deutlich verändertes osmotisch reguliertes Aktivitätsprofil aufwiesen. Die Beobachtung, dass bereits der Austausch eines einzigen Glutamats die Osmoregulation von BetP in *E. coli*-Zellen beeinflusste, deutete auf eine mögliche direkte Beteiligung dieser Aminosäure an einer Koordination von K^+ hin, dem chemischen Stimulus der BetP-Aktivierung. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die K^+ -Sensitivität von E572Q, E572K und E572D im Proteoliposomensystem bestimmt.

Der Austausch des Glutamats gegen das sterisch vergleichbare Glutamin, das positiv geladene Lysin oder gegen das ebenfalls negativ geladene Aspartat zeigte, dass die negative Ladung an dieser Position für die K^+ -Wahrnehmung und die osmotisch regulierte Aktivität keine entscheidende Rolle zu spielen scheint, da Aspartat Glutamat nicht vollständig ersetzen konnte. Der Austausch des Glutamats gegen ein Glutamin resultierte in einem BetP-Derivat, das eine verminderte osmotisch regulierte Aktivität aufwies, allerdings nahezu unempfindlich gegenüber internen K^+ -Erhöhungen war, während umgekehrt die Variante E572D zwar noch K^+ -Sensitivität, aber keine osmotisch regulierte Aktivität aufwies (Abb.18). Dies könnte bedeuten, dass sowohl die sterische Konformation als auch die Ladung des Glutamats an

dieser Position für die Chemosensorik von BetP essentiell ist. Der Einbau eines Lysins hatte den ausgeprägtesten Effekt. Die BetP-Variante E572K zeigte keine osmotisch regulierte Transportaktivität und war unempfindlich gegenüber internen Kaliumionenerhöhungen. Auf Grund dieser Analysen wurde gefolgert, dass die Aminosäure Glutamat an Position 572 der C-terminalen Extension für die Chemosensorik und für Osmoregulation von BetP in einer Membranumgebung aus *E. coli*-Phospholipiden essentiell sein muss. Allerdings sind bei dieser Interpretation folgende Punkte zu beachten: Der Austausch von E572 führt zu BetP-Varianten, deren Aktivität sich bei einer niedrigen externen Osmolalität bzw. einer geringen internen K^+ -Konzentration durch Erhöhung der externen Osmolalität oder der internen Kaliumionenkonzentration nur noch geringfügig im Vergleich zu BetP C252T steigerte. Diese geringe Aktivierbarkeit könnte auf eine erniedrigte Affinität zum Cosubstrat zurückgeführt werden, ein Phänomen, das bereits bei der C-terminal verkürzten BetP-Variante C Δ 25 beobachtet werden konnte. Die K_m -Bestimmungen für Na^+ in *E. coli*-Zellen lassen allerdings nicht auf eine erniedrigte Affinität zum Cosubstrat dieser BetP-Varianten schließen. Daher wird auf Grund der beobachteten guten Vergleichbarkeit des Aktivitätsverhaltens in ganzen Zellen und in Proteoliposomen davon ausgegangen, dass diese BetP-Derivate in ihrer Aktivität unter hyperosmotischen Bedingungen nicht dereguliert, sondern über einen Grundlevel hinaus nicht weiter aktivierbar sind.

Ist E 572 der C-terminalen Domäne tatsächlich direkt für die Wahrnehmung von Kaliumionen verantwortlich? Da eine Kaliumbindung nicht direkt über eine Protein/ K^+ -Wechselwirkung gemessen, sondern indirekt über die Transportaktivität des Carriers interpretiert wird, ist die Zuordnung einer Kaliumbindestelle zu einzelnen Aminosäuren der C-terminalen Extension ohne zusätzliche strukturelle Information unmöglich. D.h., eine osmotisch nicht mehr regulierte BetP-Variante muss nicht zwangsläufig die Fähigkeit zur spezifischen Kaliumbindung verloren haben. Sie könnte ebenso gut nur in der Signaltransduktion beeinträchtigt sein. Ein weiterer kritischer Punkt ist die Energetisierung von rekonstituiertem BetP im verwendeten Messsystem. Die elektrische Komponente des elektrochemischen Natriumpotenzials wird durch ein nach außen gerichtetes K^+ -Diffusionspotenzial hergestellt. Daher wurde unter allen Messbedingungen stets eine interne K^+ -Konzentration von mindestens 34 mM bereitgestellt. Die Notwendigkeit einer K^+ -Verfügbarkeit für die Transportaktivität von BetP ist somit nicht bekannt. Daher wäre es möglich, dass die osmotisch deregulierte Aktivität der C-terminal verkürzten BetP-Variante BetP C Δ 25 völlig unabhängig von K^+ ist oder, dass BetP C Δ 25 bereits bei verhältnismäßig geringen K^+ -Konzentrationen maximal aktiviert ist. Die Einstellung eines Membranpotenzials ohne

Beteiligung von Kalium, z.B. durch Wahl eines anderen Ionophors oder durch die Co-Rekonstitution von Bacteriorhodopsin zur Erzeugung eines Protonenpotenzials könnte zur Klärung dieses Sachverhaltes beitragen. Darüber hinaus spricht die Tatsache, dass im Prinzip alle C-terminalen BetP-Varianten unter hyperosmotischen Bedingungen zwar graduell unterschiedliche, aber geänderte Aktivitätsprofile im Vergleich zu BetP C252T aufwiesen, für eine Beteiligung weiterer Aminosäuren dieser Domäne bei der Wahrnehmung von osmotischem Stress und bei der Aktivitätsregulation unter hyperosmotischen Bedingungen.

Trotz der beschriebenen Einwände sprechen die vorliegenden Daten nicht gegen eine direkte Beteiligung des Glutamatrestes 572 der C-terminalen Extension an der K⁺-abhängigen Aktivierung von BetP.

Die Aktivitätsregulation von BetP C252T wird von der Membranumgebung beeinflusst

Der Großteil der Untersuchungen zur Osmoregulation von BetP wurde mit *E. coli*-Zellen bzw. mit Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden gemacht. Das Proteoliposomensystem bietet allerdings auch die Möglichkeit, die Lipidzusammensetzung der Membran direkt zu variieren, um mögliche Einflüsse dieser Manipulation auf ein rekonstituiertes Membranprotein zu studieren. Dass die Membran die Aktivität von BetP direkt beeinflussen kann, bestätigten Beobachtungen in ganzen Zellen. In *E. coli* ist der Schwellenwert der BetP-Aktivierung im Vergleich zu *C. glutamicum* zu niedrigeren Osmolalitäten verschoben (Peter *et al.*, 1998b; Rübenhagen *et al.*, 2000). Der Grund dieser Verschiebung des Aktivitätsoptimums könnte in der unterschiedlichen Membranzusammensetzung der Organismen liegen. Während die Zellmembran von *E. coli* zu 80% aus PE und etwa 20% aus PG und DPG (Cardiolipin) besteht (Prasad, 1996), setzt sich die Cytoplasmamembran von *C. glutamicum* überwiegend aus negativ geladenen Phospholipiden (mind. 87% PG) zusammen (Hoischen und Krämer, 1990). Außerdem lässt sich die Aktivität von BetP durch amphipathische Substanzen, die durch Insertion in die Membran den physikalischen Status der Lipiddoppelschicht modulieren, sowohl in Proteoliposomen, als auch in Zellen beeinflussen (Rübenhagen *et al.*, 2000; Steger, 2002). Der Einfluss dieser sogenannten Lokalanästhetika auf die Aktivitätsregulation eines osmoregulatorischen Transportproteins ist ebenso bei dem ABC-Transporter OpuA aus *L. lactis* beobachtet worden (van der Heide *et al.*, 2001).

Um weitere Hinweise auf die molekularen Grundlagen der BetP-Aktivierung in Abhängigkeit der nativen Membranumgebung zu erhalten, wurde die Phospholipidzusammensetzung durch Fusion von Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden mit Protein-freien Liposomen aus synthetischen Phospholipiden variiert. Eine Präparation von Membranen aus *C. glutamicum*,

die direkt zur Rekonstitution eingesetzt werden konnten, war auf Grund des hohen Mycolatgehalts der Zellwand dieses Bakteriums (Wolf, 2002) nicht möglich (Rübenhagen *et al.*, 2000). Zur Nachahmung einer *C. glutamicum*-ähnlichen Membran wurden Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden mit unterschiedlichen Mengen an DOPG-Liposomen fusioniert. Als notwendige Kontrolle wurden entsprechende Fusionen mit DOPC/DOPE-Liposomen durchgeführt. Die Untersuchung von BetP C252T in Proteoliposomen variierender Phospholipidzusammensetzung zeigte drei Unterschiede hinsichtlich der Aktivitätsregulation des Carriers, die nur auf den Charakter der Lipiddoppelschicht zurückgeführt werden können. Erstens führte die Zunahme des DOPG-Gehalts zu einer Verschiebung des Schwellenwertes der BetP-Aktivität zu höheren Osmolalitäten, während die Zunahme des DOPC/DOPE-Gehalts diesen Schwellenwert zu niedrigeren Osmolalitäten verschob (Abb. 24 A&B). Mit zunehmendem Anteil des synthetischen Phospholipids nahm die spezifische Aktivität von BetP ab. Zweitens nahm der Grad der Aktivierbarkeit in DOPG-dotierten Proteoliposomen zu, während er in DOPC/DOPE-dotierten Proteoliposomen deutlich zurückging (Abb. 25). So war beispielsweise eine Steigerung der Transportrate von BetP C252T in einer Lipidumgebung von 17% *E. coli*-Lipiden und 83% DOPC/DOPE bei externen Osmolalitäten von 0,1 bis 0,4 osmol/kg um den Faktor 1,8 zu beobachten, während die Aktivität in reinen *E. coli*-Lipiden in diesem Osmolalitätsbereich um den Faktor 5,8 zunahm. Da BetP C252T nachweislich durch Änderungen der Kaliumionenkonzentration stimuliert wird, musste die verminderte Aktivierung auf den Einfluss der Lipide auf den Carrier zurückzuführen sein. Drittens unterschied sich die Aktivität des Proteins bei identischem internem K^+ -Gehalt unter isoosmotischen Bedingungen. Während in DOPC/DOPE-dotierten Proteoliposomen (33-83% w/w DOPC/DOPE) unter isoosmotischen Bedingungen bereits 30-55% der maximalen Aktivität beobachtet werden konnten, waren in einer DOPG-haltigen Membranumgebung nur ca. 8-11% der maximalen Transportaktivität bestimmt worden. Dies bedeutet, dass der Gehalt an Phospholipiden mit negativer Nettoladung, die zur Aktivierung von BetP benötigte Kaliumkonzentration bestimmt. Somit wäre in DOPC/DOPE-dotierten Proteoliposomen eine geringere K^+ -Konzentration zur BetP-Aktivierung nötig. In den mit synthetischen Phospholipiden dotierten Proteoliposomen wurden gleiche interne Kaliumionenkonzentrationen vorgelegt. Daher sind folgende Szenarien für die beschriebenen Unterschiede der osmotischen Aktivierbarkeit von BetP C252T in Abhängigkeit der Phospholipidzusammensetzung denkbar: Die freie Verfügbarkeit von K^+ zur Interaktion und somit zur Aktivierung von BetP ist in beiden Systemen unterschiedlich, da mit Zunahme des Gehalts an synthetischen Phospholipiden mehr

Kaliumionen an die negative DOPG-haltige als an die neutrale DOPC/DOPE-haltige Lipidoberfläche binden. Diese Möglichkeit ist unwahrscheinlich, da der interne Puffer (100 mM KP_i pH 7,5) der Proteoliposomen als auch der synthetischen Liposomen sowohl bei der Herstellung der Liposomen als auch bei der Fusionsreaktion gleich ist. D.h., die negative Lipidoberfläche ist bereits vor der Liposomenfusion mit K^+ gesättigt. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Kaliumbindung pH-abhängig ist, d.h., der durch Zunahme des PG-Gehalts erniedrigte pH an der Lipid/Protein-Grenzfläche erschwert die spezifische K^+ -Bindung durch BetP, da der pK von möglichen K^+ -koordinierenden Aminosäureresten erhöht ist. Dies ließe sich durch Bestimmung der BetP-Aktivierung in Abhängigkeit des pH überprüfen. Ist die Kaliumbindung tatsächlich pH-abhängig, wäre der Grad der Aktivierbarkeit zu niedrigeren pH-Werten verschoben, d.h., je saurer der intraliposomale Bereich, desto höher muss die interne Kaliumionenkonzentration zur BetP-Aktivierung sein. Ein ähnliches Phänomen ist bei TREK-1, einem mechanosensitiven K^+ -Kanal, der unter anderem im Nervengewebe von Säugetieren vorkommt, zu beobachten. Hier erleichtert die Protonierung eines Glutamatrestes innerhalb der C-terminalen Domäne die Öffnung des Kanals durch Wechselwirkung der C-terminalen Domäne mit der Membran (Honore *et al.*, 2002).

Darüber hinaus wäre denkbar, dass die K^+ -Erkennung und Bindung durch BetP unabhängig von der Membranumgebung erfolgt, aber der Übergang zur katalytisch aktiven Konformation des Proteins durch Protein/Membran-Wechselwirkung erschwert ist. Diese Interaktion würde demnach mit dem Anteil der negativen Ladung zunehmen. Dies bedeutet, dass die Stärke dieser Wechselwirkung durch die Bindung von K^+ abgeschwächt und die Konformationsänderung in die katalytisch aktive Form des Carriers dadurch erleichtert wird. Demzufolge wäre die osmotisch regulierte Aktivität von BetP von einer durch K^+ -Bindung regulierten Wechselwirkung der C-terminalen Extension mit der Lipiddoppelschicht abhängig.

Der PG-Gehalt der Membran bestimmt die Regulation der Transportaktivität von BetP unter hyperosmotischen Bedingungen

Zur Überprüfung, ob Glutamat 572 ebenfalls in der nativen Membranumgebung in der K^+ -abhängigen Aktivitätsregulation von BetP involviert ist, sollten einzelne BetP-Varianten gereinigt und deren osmoregulatorische und chemosensorische Eigenschaften in Proteoliposomen mit zunehmendem Anteil an Phosphatidylglycerol, dem hauptsächlichen Phospholipid in der Zellmembran von *C. glutamicum*, charakterisiert werden. Zunächst wurde

zur Kontrolle der Expression und der *in vivo*-Aktivität der BetP-Varianten die Betainaufnahmerate unter Erhöhung der externen Osmolalität in Zellen bestimmt. Überraschenderweise wiesen alle BetP-Derivate, außer BetP CΔ25, eine im Vergleich zu BetP C252T geringere, aber deutliche osmotisch regulierte Aktivität auf (vergl. 23A&B). Dieses Ergebnis implizierte, dass die unterschiedlichen Zusammensetzungen der Zellmembran beider Organismen für dieses Phänomen verantwortlich sind. Tatsächlich konnte das in Zellen beobachtete Ergebnis durch Aktivitätsmessungen der BetP-Derivate E575K, E572C und 572AAA in Proteoliposomen mit variierendem Gehalt an synthetischen Phospholipiden bestätigt werden (Abb. 26). In Proteoliposomen mit einem Gesamtanteil an DOPG von 46% (Endkonzentration an PG) waren die BetP-Varianten in ihrer Aktivität osmotisch reguliert, während sie in den entsprechenden Kontrollmessungen in DOPC/DOPE-dotierten Proteoliposomen weder osmotisch reguliert, noch K⁺-sensitiv waren (E572K in Abb. 27). Unter der Annahme, dass BetP auch in PG-dotierten Proteoliposomen bzw. in *C. glutamicum* durch eine Erhöhung der intraliposomalen K⁺-Konzentration aktiviert wird, könnte somit eine Koordination von K⁺ nicht ausschließlich durch Glutamat an Position 572 erfolgen.

Interessanterweise resultierte die Deletion der letzten 25 Aminosäuren unabhängig von der Natur der umgebenden Membran in einer deregulierten BetP-Variante (vergl. Abb. 24D). Somit ist auch in der nativen Membrenumgebung die Fähigkeit zum *osmosensing* und zur Osmoregulation von einer intakten C-terminalen Domäne abhängig. Allerdings zeigt die sowohl in Zellen als auch in DOPG-dotierten Proteoliposomen beobachtete Verschiebung des Schwellenwerts zur BetP-Aktivierung, dass die gesamte native Primärstruktur der C-terminalen Extension eine Rolle bei der Osmoregulation von BetP spielt. Die Sekundärstrukturvorhersage der C-terminalen Extension von BetP sagt für den mittleren Teilbereich der C-terminale Extension eine α -helikale Struktur voraus. Diese Sekundärstruktur wird durch alle in dieser Arbeit durchgeführten Aminosäureaustausche innerhalb der C-terminalen Extension laut Vorhersage nicht beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt). Spektroskopische Untersuchungen bestätigten die Fähigkeit der C-terminalen Extension zur Ausbildung einer α -Helix in Gegenwart von amphiphilen Oberflächen. Darüber hinaus lassen Plasmon Resonanz Studien mit der isolierten C-terminalen Extension auf Wechselwirkungen dieses Proteinbereiches sowohl mit Lipidoberflächen, als auch mit internen Schleifen schließen (Burger, 2001). Offensichtlich scheint die native Primärstruktur der C-terminalen Extension, insbesondere die endständigen 25 Aminosäuren, kritisch für die in der Chemosensorik und Signaltransduktion des Carriers notwendige Protein/Lipid und/oder

Protein/ K^+ -Interaktion zu sein. Die oben angesprochene helikale Struktur der C-terminalen Extension, sowie die beobachteten Wechselwirkungen isolierter Peptide mit Lipidoberflächen, und die Tatsache, dass BetP $\Delta 25$ unabhängig von der Lipidumgebung dereguliert ist, während die Regulierbarkeit von BetP-Varianten mit einzelnen Substitutionen innerhalb dieser Domäne von der Lipidumgebung abhängt, lassen den Schluss zu, dass für die Chemosensorik und die Signaltransduktion eine spezifische K^+ /Protein/Lipid-Wechselwirkung unter Beteiligung der gesamten C-terminalen Extension stattfinden muss. Unter Umständen ist die Struktur der positiv geladenen C-terminalen Extension in Abhängigkeit der Ladung der interagierenden Lipidoberfläche variabel und exponiert mögliche zu E572 alternative K^+ -Koordinationsstellen. Oder die Koordinierbarkeit von K^+ durch Aminosäuren der Extension ist abhängig von pK-Verschiebungen ionisierbarer Seitenketten hervorgerufen durch unterschiedliche Wechselwirkungen der C-terminalen Domäne mit verschiedenen Phospholipidschichten. In jedem Fall scheint der PG-Gehalt an den beschriebenen Phänomenen maßgeblich beteiligt zu sein.

Zukünftige Experimente müssen klären, auf welche Weise BetP spezifisch mit K^+ interagiert und welche Funktion die C-terminale Domäne bei der Chemosensorik oder der Signaltransduktion spielt. Die Fähigkeit zur Diskriminierung verschiedener ähnlicher Kationen spricht für eine spezifische K^+ -Bindestelle. Innerhalb der Primärstruktur der C-terminalen Domäne konnte kein von K^+ -Kanälen bekanntes Motiv gefunden werden, das spezifisch an einer K^+ -Bindung oder K^+ -Erkennung beteiligt sein könnte. Allerdings befindet sich in der Schleife 2 zwischen der zweiten und dritten Transmembranhelix ein Aminosäuremotiv, das gewisse Ähnlichkeit zur Kaliumbindestelle der Pyruvat-Kinasen aus *E. coli*, Hefe und Mensch aufweist (Jurica *et al.*, 1998). Ortsspezifische Mutagenesestudien innerhalb dieser Schleife werden die mögliche Bedeutung dieses Motivs in der K^+ -Detektion offen legen.

Für die Intensität der Wechselwirkung der C-terminalen Domäne mit der Membran ist die Primärstruktur der C-terminalen Extension wichtig. *Resonant mirror*-Studien mit isolierten C-Extensionen der in *E. coli* deregulierten BetP-Varianten könnten Aufschluss darüber geben, ob die Wechselwirkung der C-terminalen Extension mit der Membran tatsächlich durch die Substitution einzelner Aminosäuren moduliert wird. Hierbei wäre auch die Auswirkung einer Substitution des Glutamat an Position 572 gegen ein Prolin und/oder Glycin auf die postulierte C-Extension/Lipid-Wechselwirkung interessant.

Der Einfluss der Phospholipide auf die Aktivitätsregulation kann in zukünftigen Experimenten durch die Rekonstitution von BetP in Liposomen aus rein synthetischen Phospholipiden untersucht werden. Hierbei kann die Lipidzusammensetzung durch Fusion von Proteoliposomen mit Liposomen unterschiedlicher Phospholipide variiert werden.

Zur Untersuchung einer möglichen pH-Abhängigkeit der BetP-Aktivierung sollte der interne Puffer der Vesikel variiert und die Carrieraktivität in Abhängigkeit der externen Osmolalität untersucht werden. Hierbei sollten sowohl BetP C252T, als auch in *E. coli*-Lipiden nachweislich K⁺-insensitive BetP-Varianten in Proteoliposomen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung überprüft werden.

BetP im Vergleich zu anderen Osmosensoren

Neben BetP sind zwei weitere bakterielle Transportsysteme bekannt, die im rekonstituierten System osmoregulatorische und somit osmosensorische Eigenschaften haben, zum einen ProP aus *E. coli* und OpuA aus *L. lactis*. ProP, der sekundäre H⁺/kompatible Solute Symporter der MFS-Familie besteht ebenfalls aus zwölf Transmembranhelices und cytoplasmatischen terminalen Domänen. ProP wird sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* mit einer Halbaktivierungszeit von 1 Minute viel langsamer aktiviert als BetP, das unmittelbar nach einem osmotischen *upshift* aktiv ist (Milner *et al.*, 1988; Kunte *et al.*, 1999). Anders als die C-Extension von BetP ist die C-terminale Domäne von ProP in der Lage eine *coiled coil*-Struktur auszubilden. Dieser Domäne wird auch eine osmoregulatorische Funktion zugeschrieben, da zum einen Substitutionen von Aminosäuren, die die ausgebildete *coiled coil*-Struktur verstärken, den Schwellenwert der ProP-Aktivierung (Culham *et al.*, 2000) erhöhen und zum anderen eine C-terminale Deletionsmutante (CA26, Gesamtlänge 65 Aminosäuren) zwar noch in die Membran inseriert wird, aber im Gegensatz zu BetP CA25 nicht mehr aktiv ist. Dies spricht ebenfalls für eine Beteiligung der C-terminalen Domäne in der Osmoregulation des Transporters. Zwar ist ProP ohne zusätzliche Faktoren in der Lage osmotische Stresssituationen wahrzunehmen, allerdings wird die Aktivität des Transporters durch ProQ, einem löslichen *E. coli*-Protein, erhöht (Kunte *et al.*, 1999). Für BetP ist kein zusätzlicher Faktor bekannt, der die Aktivität des Proteins beeinflusst bzw. verstärkt. Zusätzlich variiert die Substrataffinität von ProP mit der externen Osmolalität (Racher *et al.*, 2001). Dieses Phänomen wird dadurch erklärt, dass osmotische Gradienten über der Membran die Konformation des Transporters in der Lipiddoppelschicht und somit seine katalytische Aktivität beeinflussen. Im Gegensatz dazu ändern sich die kinetischen Konstanten, soweit bestimmt, von BetP nicht mit Änderungen der externen Osmolalität. Hinsichtlich des

osmosensing-Mechanismus von ProP und BetP sind folgende Unterschiede und Gemeinsamkeiten zu beobachten. Für beide Transporter konnten Änderungen in der Membranspannung durch mechanische Deformation der Vesikel durch osmotisch induzierte Volumenreduktion (Wasserausstrom) als mögliches Aktivierungssignal ausgeschlossen werden (White *et al.*, 2000; Rübenhagen *et al.*, 2001). Beide Transporter werden somit durch osmotisch bedingte Konzentrationsänderungen intraliposomaler Solute aktiviert. Im Vergleich zur K^+ -spezifischen Aktivierung von BetP wird ProP sowohl durch interne Kationen, als auch durch kleine Membran-impermeable Solute (PEG) aktiviert. Diese sollen den internen Gehalt an Makromolekülen und deren Verhalten unter hyperosmotischen Bedingungen in der Zelle imitieren (*macromolecular crowding*) und somit die Hydrathülle des Transporters beeinflussen (Culham *et al.*, 2003b). Eine Stimulation von BetP durch makromolekulares *crowding* ist noch nicht untersucht worden. Somit sind nur annähernd Gemeinsamkeiten zwischen ProP und BetP bezüglich eines allgemeingültigen *osmosensing*-Mechanismus zu erkennen.

Im Gegensatz zu den sekundären Carriern BetP und ProP ist OpuA ein Bindeprotein-abhängiger ABC-Transporter. Die katalytische Aktivität wird ebenfalls wie bei ProP und BetP auf Expressions- und Aktivitätsebene reguliert (van der Heide und Poolman, 2000b). Der Transporter ist wie BetP unmittelbar nach einem hyperosmotischen Schock aktiv. Die OpuA-Aktivität wird im Proteoliposomensystem ebenfalls durch eine Erhöhung der internen Ionenstärke stimuliert (van der Heide und Poolman, 2000a). Im Gegensatz zu ProP und BetP wird für OpuA diskutiert, dass der Einfluss der internen Ionenstärke auf die Liposomenmembran den Transporter aktiviert. Hierbei führt eine osmotisch bedingte Erhöhung der internen Ionenstärke zu Änderungen der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen OpuA und den geladenen Kopfgruppen der Phospholipide der umgebenden Membran (van der Heide *et al.*, 2001). Allerdings sind spezifische Proteinbereiche des ABC-Transporters, die diese Art von osmotischen Stimulus wahrnehmen sollen, nicht bekannt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die osmotisch regulierten Transportsysteme einen cytoplasmatischen osmotischen Stimulus wahrnehmen. Dabei detektieren ProP und BetP im Gegensatz zu OpuA den osmotischen Stimulus offenbar direkt, d.h., dass das osmotische Signal (K^+ , *macromolecular crowding*) unmittelbar vom Protein wahrgenommen wird. Im Gegensatz dazu nimmt OpuA den osmotischen Stimulus (Ionenstärke) über die Wechselwirkung der Membran mit dem Transporter wahr. Zumindest für BetP scheint eine regulatorische Bindestelle für ein osmotisches Signal (K^+) vorhanden zu sein. Allerdings ist

5. Zusammenfassung

Unter hyperosmotischem Stress akkumuliert *Corynebacterium glutamicum* kompatible Solute durch Synthese und/oder Aufnahme aus dem umgebenden Medium. Die Aufnahme der kompatiblen Solute wird durch die vier sekundären Transportproteine BetP, EctP, ProP und LcoP vermittelt. BetP katalysiert den Transport von Betain im Symport mit zwei Natriumionen und ist auf Aktivitäts- und Expressionsebene reguliert. Um die osmosensorischen und osmoregulatorischen Eigenschaften des Carriers zu untersuchen, wurde BetP mit Hilfe eines N-terminalen StreptagII gereinigt und in Proteoliposomen rekonstituiert. Durch immunologische und proteolytische Studien an BetP in Proteoliposomen konnte die unidirektionale Rekonstitution des Carriers in die Liposomenmembran nachgewiesen werden. Die N- und C-terminale Extension ist im Lumen der Proteoliposomen lokalisiert. Eine Verkürzung der C-terminalen Domäne hatte dabei keinen Einfluss auf die Orientierung des Transporters innerhalb der Lipiddoppelschicht. Untersuchungen zur Ionenselektivität der BetP-Aktivierung ergaben, dass Na^+ die BetP-Aktivität im Gegensatz zu K^+ nicht stimuliert. Somit ist die Stimulation der katalytischen Aktivität von BetP in Proteoliposomen spezifisch für Kaliumionen. Die funktionelle Rekonstitution von C-terminal verkürzten BetP-Varianten in Proteoliposomen aus *E. coli*-Phospholipiden zeigte eine Beteiligung der endständigen 25 Aminosäuren der C-terminalen Domäne an der Osmoregulation und Osmosensorik von BetP. Damit konnte die osmosensorische Domäne von BetP innerhalb der C-terminalen Extension nachgewiesen werden. Mit Hilfe eines *alanine scanning*, sowie durch den Austausch einzelner Glutamatreste innerhalb dieser putativen Sensordomäne konnten Aminosäuren identifiziert werden, die an der Osmoregulation und K^+ -Wahrnehmung des Carriers beteiligt sind. Die Substitution eines Glutamat innerhalb der Sensordomäne führte zum Verlust der osmoregulatorischen und K^+ -abhängigen Aktivierung von BetP in Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden. Dabei war das Ausmaß der Deregulation der Carrieraktivität von der Lipidumgebung abhängig. So konnte durch Variation der Phospholipidzusammensetzung der Proteoliposomen die osmoregulatorische Eigenschaft von BetP moduliert werden. Die *in vitro* erhaltenen Daten zur Chemosensorik des Proteins wurden durch physiologische Studien zur Osmoregulation des Transporters in *E. coli*- und *C. glutamicum*-Zellen untermauert.

6. 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., Baroundi, EL, Godon, S.M., McLean, W.F.H., und Rogers, D.J. 1981.** Extraction, purification and characterization of Dragendorff-positive compounds from British marina algae. *Botanica marina* **23**, 451-456.
- 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.
- Bremer E., und Krämer R. 2000.** Coping with osmotic challenges: Osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In: Storz, G., Hengge-Aronis, R. (Herausgeber), *Bacterial Stress Response*. ASM Press, Washington, DC, USA, 79-97.
- Brown, A. D., Kylie, F., Mackenzie, F. und Singh, K. K. 1986.** Selected aspects of microbial 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.
- Cayley, S., Lewis, B.A., Guttman, H.J. und Record, M.T. 1991.** Characterisation of the cytoplasm of *Escherichia coli* K-12 as a function of external osmolarity. *J. Mol. Biol.* **222**: 281-300.
- Chater , K. F. und Nikaido H. 1999.** *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 121-125
- 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.
- Culham, D. E., Dalgado C., Gyles, C. L., Mamelak, D., MacLellan, S. und Wood, J. M. 1998.** Osmoregulatory transporter ProP influences colonization of the urinary tract by *Escherichia coli*. *Microbiology.* **144**, 91-102.
- 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.

- Culham, D. E., Lu, A., Jishage, M., Krogfelt, K. A., Ishihama, A. und Wood, J. M. 2001.** The osmotic stress response and virulence in pyelonephritis isolates of *Escherichia coli*: contributions of RpoS, ProP, ProU and other systems. *Microbiology*. **147**, 1657-1670.
- Culham, D.E., Hillar, A., Henderson, J., Ly, A., Yaroslava I., Vernikovska, Racher, K. I., Boggs, J. M. und Wood, J.M. 2003a.** Creation of a fully functional Cysteine-less variant of osmosensor and proton-osmoprotectant symporter ProP from *Escherichia coli* and its application to assess the transporter's membrane orientation. *Biochemistry* **42**, 11815-11823.
- Culham, D.E., Henderson, J., Crane, R.A. und Wood, J.M. 2003b.** Osmosensor ProP of *Escherichia coli* responds to the concentration, chemistry, and molecular size of osmolytes in the proteoliposome lumen. *Biochemistry* **42**, 410-420.
- 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.
- Fang, G., Friesen, R., Lanfermeijer, F., Hagting, A., Poolman, B. und Konings, W.N. 1999.** Manipulation of activity and orientation of membrane-reconstituted di-tripeptide transport protein DtpT of *Lactococcus lactis*. *Mol. Membr. Biol.* **16**: 297-304.
- Farwick, M., 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.
- Garner, M. M. und Burg, M. B. 1994.** Macromolecular crowding and confinement in cells exposed to hypertonicity. *Am. J. Physiol.*, **266**, C877-C892.
- Glaasker, E., Konings, W. N. und Poolman, B. 1996.** Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **178**, 575-82.
- 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.
- Haardt, M. Kempf, B., Faatz, E. und Bremer, E. 1995.** The osmoprotectant proline betaine is a major substrate for the binding-protein-dependent transport system ProU of *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet.* **246(6)**:783-6.
- Hanahan, D. 1985.** Techniques for transformation of *Escherichia coli*. Seite 109-136. In Glover, D. M. (ed.), DNA cloning, **1**, IRL Press, Oxford.
- Hohmann, I., Bill, R. M., Kayingo, I. und Prior, B. A. 2000.** Microbial MIP channels. *Trends Microbiol.* **8**, 33-38.

- Hoischen, C. und Krämer, R. 1990.** Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **172**: 3409-3416.
- Honoré, E., Maingret, F., Lazdunski, M., und Patel A. J. 2002.** An intracellular proton sensor commands lipid- and mechano-gating of the K⁺ channel TREK-1. *EMBO J.* **21**, 2968-2976.
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H. 1990.** High efficiency transformation of *E. coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Jakoby, M., Krämer, R. und Burkovski, A. 1999.** Nitrogen regulation in *Corynebacterium glutamicum*: isolation of genes involved and biochemical characterization of corresponding proteins. *FEMS Microbiol Lett.* **173(2)**: 303-10.
- Jin, T., und Inouye, M. 1995.** Identification of the genes in multicopy plasmids affecting ompC and ompF expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **133(3)**:225-31.
- Jung, K., Veen, M. und Altendorf, K. 2000.** K⁺ and ionic strength directly influence the autophosphorylation activity of the putative turgor sensor KdpD of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**: 40142-40147.
- Jung, K., Hamann, K. und Revermann, A. 2001.** K⁺ stimulates specifically the autokinase activity of purified and reconstituted EnvZ of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **276**: 40896-40902.
- Jung, K. und Altendorf, K. 2002.** Towards an understanding of the molecular mechanisms of stimulus perception and signal transduction by the KdpD/KdpE system of *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **4(3)**:223-8.
- Jurica, M.S., Mesecar, A., Heath, P.J., Shi, W., Nowak T., und Stoddard B.L. 1998.** The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. *Structure* **6**, 195-210.
- 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.
- 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.
- Knol, J., Sjollem, K., und Poolman B., 1998.** Detergent-mediated reconstitution of membrane proteins. *Biochemistry* **37(46)**:16410-5.
- Koch, A. 1983.** The surface stress theory of microbial stress morphogenesis. *Adv. Microbiol. Physiol.* **24**, 301-336.
- Krämer R. 1994.** Functional principles of solute transport systems: concepts and perspectives. *Biochim Biophys Acta.* **1185(1)**:1-34.

- Kunte, H. J., Crane, R. A., Culham, D. E., Richmond, D. und Wood, J. M. 1999.** Protein ProQ influences osmotic activation of compatible solute transporter ProP in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **181**:1537-43.
- Kyhse-Andersen, J. 1984.** Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacryamide 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.
- 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., Töttemeyer, 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.
- Ley, O. 2001.** Bedeutung der Prolin-Biosynthese bei der Osmoregulation von *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- 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.
- Milner, 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.
- Möker, N., Schaffer, S., Brocker M., Krämer R., Morbach S. und Bott M.** Deletion of the genes encoding the MtrA-MtrB two-component system of *Corynebacterium glutamicum* has a strong influence on cell morphology, antibiotics susceptibility and osmoprotection. In Vorbereitung.
- 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.
- 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.

- Munro, G.F., Hercules, K., Morgan, J. und Sauerbier, W. 1972.** Dependence of the putrescine content of *Escherichia coli* on the osmotic strength of the medium. *J. Biol. Chem.* **247**: 1272-1280.
- Nottebrock, D., Meyer, U., Krämer, R. und Morbach S. 2003.** Molecular and biochemical characterization of mechanosensitive channels in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **218**, 305-309.
- Orlowski, J. und Grinstein, S. 1997.** Na⁺/H⁺ exchangers of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 22373-22376.
- 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., Bader, A., Burkovski, A., Lambert, C. und Krämer, R. 1997.** Isolation of the *putP* gene of *Corynebacterium glutamicum* and characterization of a low affinity uptake system for compatible solutes. *Arch. Microbiol.* **168**, 143-151.
- Peter, H., Weil, B., Burkovski, A., Krämer, R. und Morbach, S. 1998a.** *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.
- Peter, H., Burkovski, A. und Krämer, R. 1998b.** Osmo-sensing by N- and C-terminal extensions of the glycine betaine uptake system BetP of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* **273**, 2567-2574.
- Poolman, B. und Glaasker, E. 1998.** Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol.* **29**, 397-407.
- Prasad, R. 1996.** *Manual on Membrane Lipids*, Springer, Heidelberg.
- Qin, L., Yoshida, T. und Inouye, M. 2001.** The critical role of DNA in the equilibrium between OmpR and phosphorylated OmpR mediated by EnvZ in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **98**, 908-913.
- 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.
- Racher, K. I., Culham, D. E. und Wood, J. M. 2001.** Requirements for osmosensing and osmotic activation of transporter ProP from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **40**, 7324-7333.
- Rigaud, J.L., Pitard, B. und Levy, D. 1995.** Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1231**: 223-246.
- Rönsch, H. 2000.** Untersuchungen zum Einfluss der Osmoregulation auf die Aminosäureproduktion mit *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Universität zu Köln
- Rönsch, H., Krämer R. und Morbach, S. 2003.** Impact of osmotic stress on volume regulation, cytoplasmic solute composition and lysine production in *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B. *J. Biotechnol.* **104**, 87-97.

- 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.
- Rübenhagen, R. 2001.** Der Glycinbetain-Transporter BetP aus *Corynebacterium glutamicum* als Osmosensor. Dissertation, Universität zu Köln.
- Ruffert, S., Lambert, C., Peter, H., Wendisch, V.F. und Krämer, R. 1997.** Efflux of compatible solutes in *Corynebacterium glutamicum* mediated by osmoregulated channel activity. *Eur. J. Biochem.* **247**: 572-580.
- Ruffert, S., Berrier, C., Krämer, R. und Ghazi, A. 1999.** Identification of mechanosensitive ion channels in the cytoplasmic membrane of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **181**, 1673-1676.
- 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.
- Schaffner, W. und Weissmann, C. 1973.** A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal. Biochem.* **56**: 502-514.
- Schiller D., 2000.** Untersuchungen zur Exkretion niedermolekularer Metabolite in *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Schiller, D., Kruse, D., Kneifel, H., Krämer, R. und Burkovski A. 2000.** Polyamine transport and role of *potE* in response to osmotic stress in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* **182**, 6247-6249.
- Schmidt, T.G.M., Koepke, J., Frank, R. und Skerra, A. 1996.** Molecular interaction between the *Strep*-tag affinity peptide and its cognate target streptavidin. *J. Mol. Biol.* **255**: 753-766.
- Steger, R. 2002.** Vergleichende Studien zur Aktivitätsregulation osmosensitiver Transporter aus *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Universität zu Köln.
- Steverding, D., Thiel, C., Kadenbach, B., Capitanio, N. und Papa, S. 1989.** Influence of surface charge on the incorporation and orientation of cytochrome c oxidase in liposomes. *FEBS Lett.* **257**: 131-133.
- Strøm, A.R. und Kaasen, I. 1993.** Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. *Mol. Microbiol.* **8**: 205-210.
- Sukharev, S I., Blount, P., Martinac, B., Blattner, F. R. und Kung, C. 1994.** A large mechanosensitive channel in *Escherichia coli* encoded by *mscL* alone. *Nature* **368**, 265-268.

- Sukharev, 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.
- Timasheff, S. N. 1992.** Water as ligand: preferential binding and exclusion of denaturants in protein unfolding. *Biochem* **31**, 9857-9864.
- 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. 2000a.** Osmoregulated ABC transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7102-7106.
- van der Heide, T. und Poolman, B. 2000b.** Glycine betaine transport in *Lactococcus lactis* is osmotically regulated at the level of expression and translocation activity. *J. Bacteriol* **182**, 203-206.
- van der Heide, T., Stuart, M. C. und Poolman, B. 2001.** On the osmotic signal and osmosensing mechanism of an ABC transport system for glycine betaine. *EMBO J.* **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.
- Voss, S. und Skerra, A. 1997.** Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the *Strep*-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.* **10**: 975-982.
- 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.
- White, G.F., Racher, K.I., Lipski, A., Hallett, F.R. und Wood, J.M. 2000.** Physical properties of liposomes and proteoliposomes prepared from *Escherichia coli* polar lipids. *Biochim. Biophys. Acta* **1468**: 175-186.
- Wolf, A. 2002.** Trehalosesynthese in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Universität zu Köln.
- Wolf, A., Krämer, R. und Morbach, S. 2003.** Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and their significance in response to osmotic stress. *Mol Microbiol* **49**, 1119-1134.
- Wood, J.M. 1999.** Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 230-262.
- 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.

Ziegler, C., Morbach, S., Schiller, D. Krämer, R., Tziatzios, C., Schuber, D. und Kühlbrandt W.: Projection structure and oligomeric properties of the osmoregulated sodium/glycine betaine symporter BetP of *Corynebacterium glutamicum*. Zur Publikation eingereicht.

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

Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer danke ich für seine stete Diskussionsbereitschaft, seine Unterstützung und sein fortwährendes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

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

Susanne danke ich für die hervorragende Betreuung und ihre Geduld beim Korrekturlesen und Überarbeiten der Manuskripte. („Die anderen sind eigentlich gar nicht besser als wir,.....aber irgendwie erfolgreicher!“)

Kay sei gedankt für Korrekturlesen und für wertvolle Tipps, die die Arbeit sicherlich aufgewertet haben (nicht schwierig, bei diesem Niveau). Außerdem danke für den großzügigen Umgang mit Deiner Kreditkarte, sowie fürs Kofferpacken.

Christine (Dr. Ziegler) danke ich für die interessanten Einblicke in die Welt der Projektionsmappen (Wanderkarte mit Höhenlinien?) und der 2D-Kristalle.

Folgenden Kolleginnen und Kollegen danke ich und zwar:

Ralf, für die gute Zusammenarbeit im Labor (Formel 1, Börseninfos, Startseite, Kaffeepausen, alles dabei),

dem HeNinOI-Labor für die permanente Unterhaltung. Ein Quell der Freude und der Heiterkeit,

Nuran, Ute, Eva, Andreas, Udo und Martin für angenehme Zusammenarbeit und gutes Klima innerhalb der Osmowelt,

außerdem Anne, Maike, Gabi, Matthias, Andreas, Lars, Birgit, Alja, Tim, Julia, Frank, Suna, Astrid, Christian, Gabi, Klaus, Anja, Marit, Britta, Katharina, sowie meinen Praktikanten Nuran, Rebecca und Christof.

Ein außerordentliches Dankeschön an meine Lieben Eva und Kofi. „Ab Nikolaus hat der Papi wieder mehr Zeit!“

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:

Dirk Schiller
Annostr. 10
50678 Köln

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Geburtsdatum: 13. Juli 1971
Geburtsort: Neuwied
Familienstand: verheiratet, ein Kind
Nationalität: deutsch

Schulbildung

1978-1982 Grundschole Eich, Grundschole St. Peter,
Andernach
1982-1991: Kurfürst-Salentin-Gymnasium, Andernach
Abschluss: Abitur

Zivildienst

August 1991 - November 1992: Städtische Kinderheime Köln-Sülz

Berufsausbildung

September 1993 - Juli 1995: Rheinische Akademie E.V. Köln
Abschluss: Staatlich geprüfter Biologisch-
technischer Assistent

Studium

Oktober 1995 - September 1997: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn
Fachbereich: Diplom Biologie
Abschluss: Vordiplom
Oktober 1997 – Juni 2000 Universität zu Köln
Fachbereich. Diplom Biologie
Abschluss: Diplom

Promotion in Biochemie

Februar 2001 - Februar 2004 Institut für Biochemie der Universität zu Köln
Arbeitsgruppe Herr Prof. Dr. R. Krämer