

**Struktur- und Funktionsanalysen am osmotisch regulierten  
Transporter BetP aus  
*Corynebacterium glutamicum***

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

vorgelegt von

Udo Burger  
aus Lindlar-Linde

Köln, Februar 2002

---

1. Referent: Prof. Dr. Reinhard Krämer

2. Referent: Prof. Dr. Reinhard Sterner

Tag der mündlichen Prüfung (Disputation): 4. Februar 2002

---

Man muss viel studiert haben,  
um wenig zu wissen.  
(Montesquieu)

meiner alten und neuen Familie

## KURZZUSAMMENFASSUNG

*Corynebacterium glutamicum* transportiert als Reaktion auf hyperosmotischen Stress kompatible Solute wie Ectoin, Glycinbetain und Prolin in die Zelle. Einer von vier osmotisch regulierten Transportern, BetP, ist hochspezifisch für Glycinbetain. Dieser Transporter ist in der Lage, mit Hilfe seiner N-terminalen und C-terminalen Domänen osmotische Veränderungen wahrzunehmen. Die C-terminale Domäne fungiert hierbei als „Sensor“, während die N-terminale Domäne als „Modulator“ die Aktivität des Carriers reguliert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Struktur und die Wechselwirkung dieser Domänen zueinander und mit intrazellulär orientierten Proteinschleifen von BetP sowie mit Membranen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die weitgehend ungefaltete C-terminale Domäne erst mit Anbindung an amphiphile Oberflächen (Lipidmembran) einen hohen Anteil an  $\alpha$ -helikaler Struktur ausbildet. Gleiches wurde abgeschwächt bei der N-terminalen Domäne beobachtet. Eine steigende Konzentration an Kaliumionen führte ab einem Schwellenwert zum spontanen Verlust der Bindungsaffinität. Die Steigerung der Kaliumionenkonzentration in Proteoliposomen führte ebenfalls zur Aktivierung von BetP. Weitere Wechselwirkungen der C-terminalen Domäne wurden zu den cytoplasmatischen Schleifen 8, 4 und 2 von BetP in abnehmender Affinität beobachtet. Kürzere Fragmente der C-terminalen Domäne unterschieden sich in ihrer Struktur. Die membrannahen 35 Aminosäuren besaßen immer  $\alpha$ -helikale Struktur und reagierten nur unwesentlich auf Kaliumionen. Das strukturlose Peptid aus den endständigen 21 Aminosäuren verlor durch Kaliumionen die Affinität zu den Lipidoberflächen. Die *in vitro*-Daten der Reizerkennung konnten *in vivo* untermauert werden. Dabei wurde nach einem hyperosmotischen Schock eine Volumenverringerng und gleichzeitige interne  $K^+$ -Konzentrationserhöhung beobachtet. Zeitgleich wurde BetP aktiviert. Langfristig wurden akkumuliertes Kalium, Glutamat und Glutamin durch synthetisiertes Prolin in der Zelle ersetzt. Die Geschwindigkeit der Aktivierung von BetP konnte *in vitro* mit der Methode der festkörpergestützten Membranen auf 70 ms nach einem Schock bestimmt werden.

**ABSTRACT**

*Corynebacterium glutamicum* responds to hyperosmotic conditions by the accumulation of compatible solutes like ectoine, glycine betaine and proline from the environment. BetP, one of four osmotically regulated solute transporters of *Corynebacterium*, is highly specific for glycine betaine. The activity of this transporter increases with the osmolarity of the surrounding medium. Osmolarity sensing is mediated by the positively charged C-terminal extension whereas the negatively charged N-terminal extension fulfills a modulating function. To elucidate the sensing and activation mechanism of BetP it was important to study structure and function of these domains. In the present work  $\alpha$ -helical structure forming of the extensions in the presence of micelles or amphiphilic surfaces is documented. Rising the potassium concentration above a threshold level leads to the peptide being released from the surface and to the activation of BetP in liposomes. Furthermore interactions of the C-terminal extension with the cytoplasmatic loops 8, 4 and 2 of BetP were examined. Truncated forms of the C-terminal extension showed deviations in structure formation with micelles compared with the full-length peptide. The 35 amino acids most proximal to the last transmembrane helix exhibited  $\alpha$ -helical structure under all conditions. No  $\alpha$ -helical structure could be induced with the C-terminal 21 amino acids. The results on potassium effects on lipid binding by the C-terminal extension could be related to BetP activation *in vivo*. Upon hyperosmotic shock *C. glutamicum* rapidly accumulates potassium in a transient fashion followed by glutamate, glutamine and proline synthesis. Another consequence of osmotic upshock is the decrease of the cytoplasmic volume. During the first thirty minutes after upshock the volume decreases to one third of the original size. This effect could be suppressed by adding glycine betaine to the medium. By means of surface supported membrane measurements the activation time of BetP could be determined to be 70 ms.

**INHALTSVERZEICHNIS**

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Bakterienstämme, Plasmide, Nährmedien und Chemikalien	13
2.1.1	Bakterienstämme und Plasmide	13
2.1.2	Nährmedien und Kulturbedingungen	15
2.1.3	Chemikalien	15
2.2	Chemische Synthese untersuchter Peptide	16
2.3	Molekularbiologische Methoden	17
2.3.1	Polymerase-Kettenreaktion	17
2.3.2	Gelelektrophorese	18
2.3.3	Isolierung und Reinigung von DNA	19
2.3.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	19
2.3.5	Rekombination von DNA	19
2.3.6	Transformation von <i>E. coli</i>	19
2.4	Biochemische Methoden und Peptidisolation	20
2.4.1	Anzucht der Zellen	20
2.4.1.1	Anzucht im 500 ml-Maßstab	20
2.4.1.2	Anzucht durch <i>batch</i> -Fermentation im Bioreaktor	20
2.4.2	Aufschluß der Zellen	21
2.4.3	Isolation der Extensionen	21
2.4.4	Reinigung der Peptide	21
2.4.4.1	Gelfiltration und Dialyse	21
2.4.4.2	<i>Reversed Phase</i> -Chromatografie	22
2.4.5	Proteinbestimmung	22
2.4.6	SDS-PAGE	22
2.5	Spektroskopische Methoden	22
2.5.1	CD-Spektroskopie	22
2.5.1.1	Grundlagen	22

2.5.1.2	Auswertung	23
2.5.2	NMR-Spektroskopie	25
2.5.3	FT-IR-Spektroskopie	26
2.5.4	<i>Resonant Mirror</i> -Spektroskopie	27
2.5.4.1	Herstellung geeigneter Oberflächen	27
2.5.4.2	Quantifizierung von Peptid/Peptid- und Peptid/Lipid-Interaktionen	28
2.5.5	Dynamische Lichtstreuung	29
2.6	Physiologische Untersuchungen unter Osmostress	31
2.6.1	Anzucht der Zellen	31
2.6.2	Aufschluss der Zellen	32
2.6.3	Bestimmung des internen Kaliumgehaltes	32
2.6.4	Bestimmung interner Aminosäuren	32
2.6.5	Volumenbestimmung von <i>C. glutamicum</i> -Zellen	33
2.6.6	Untersuchung der Glycinbetain-Aufnahme in <i>C. glutamicum</i> -Zellen	34
2.7	Untersuchungen von BetP unter Osmostress	34
2.7.1	Präparation von Liposomen	34
2.7.2	Rekonstitution von Strep-BetP in Liposomen	34
2.7.3	Synthese von <sup>14</sup> C-Glycinbetain	35
2.7.4	Bestimmung von Transportraten	35
2.7.5	Untersuchung der Glycinbetain-Aufnahme in Proteoliposomen	36
2.7.6	Transportuntersuchung an festkörperunterstützten Membranen	36
3	ERGEBNISSE	38
3.1	Peptidreinigung	38
3.1.1	Anzucht der Zellen	38
3.1.2	Entsalzung der Peptide	40
3.2	CD-Spektroskopie	40
3.2.1	Sekundärstrukturbestimmung der C-terminalen Domäne	41
3.2.2	Sekundärstrukturbestimmung der verkürzten Peptide	45
3.2.3	Sekundärstrukturbestimmung der N-terminalen Domäne	47
3.2.4	Sekundärstrukturbestimmung von Peptidgemischen	50
3.3	FT-IR-Spektroskopie	51

3.4	NMR-Spektroskopie	53
3.5	Dynamische Lichtstreuung	56
3.6	<i>Resonant Mirror</i> -Spektroskopie	58
3.6.1	Erzeugung geeigneter Oberflächen	58
3.6.1.1	Kovalente Anbindung von Peptiden an aktivierte Oberflächen	58
3.6.1.2	Lipidbelegung nicht-derivatisierter Oberflächen	61
3.6.2	Quantifizierung von Peptid/Peptid- und Peptid/Lipid-Interaktionen	61
3.6.2.1	Peptid/Peptid-Interaktionen	61
3.6.2.2	Peptid/Lipid-Interaktionen	64
3.6.2.3	Abhängigkeit der Lipidanbindung in Anwesenheit verschiedener Solute	67
3.7	Physiologische Untersuchungen unter Osmostress	73
3.7.1	Kaliumakkumulation nach einem hyperosmotischen Schock	73
3.7.2	Volumenbestimmung des Wildtyps <i>C. glutamicum</i>	76
3.7.3	BetP-Aktivität im Wildtyp nach einem Osmoschock	77
3.7.4	Aminosäureakkumulation nach einem Osmoschock	80
3.8	Aktivierung von BetP an festkörperunterstützten Membranen	83
4	DISKUSSION	86
4.1	Strukturuntersuchungen am Sensor und Modulator	86
4.2	Interaktionspartner der terminalen Domänen	89
4.3	Die Wirkung von Soluten auf die C-terminale Domäne	90
4.4	Interne Kaliumionenkonzentration als osmotisches Signal	93
4.5	Zeitauflösung der sensorischen Eigenschaften von BetP	96
4.6	Modell zur Regulation von BetP	97
5	ZUSAMMENFASSUNG	99
6	ANHANG	101
6.1	Eindimensionale <sup>1</sup> H-NMR-Spektren	101
6.2	Zweidimensionale NOE- <sup>1</sup> H-NMR-Spektren	105
7	LITERATURVERZEICHNIS	111



**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AS	Aminosäuren
ATCC	American Type of Culture Collection
BTM	Biotrockenmasse
C <sub>12</sub> E <sub>8</sub>	Octaethylenglycol-monododecylether
CD	Circularer Dichroismus
cmc	kritische Mizellenkonzentration
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
DPC	Dodecylphosphorylcholin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	N,N,N',N'-Ethyldiamintetraacetat
FMOC-Cl	Fluoren-9-ylmethoxycarbonylchlorid
IPTG	Isopropylthiogalactosid
NMR	kernmagnetische Resonanz ( <i>nuclear magnetism resonance</i> )
NOE	Kern-Overhauser-Effekt ( <i>nuclear-overhauser enhancement</i> )
OD	optische Dichte
OG	n-Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid
OPA	o-Phthalaldehyd
PBS	Natriumphosphatpuffer ( <i>phosphate buffer saline</i> )
PEG	Polyethylenglycol
SDS	Natriumdodecylsulfat
TFE	Trifluorethanol
TG	Trockengewicht
v/w	Volumen pro Gewicht

**BASISGRÖSSEN UND EINHEITEN**

$\eta$	Viskosität
$\lambda$	Wellenlänge
$\Pi$	osmotischer Druck
$\Theta$	konzentrationsabhängige Elliptizität
$\varepsilon$	Extinktion
A	Radioaktivität [dpm]
arcs	Arcussekunden (Winkelsekunden)
$a_w$	Aktivität des Wassers
c	Konzentration eines Moleküls
Ci	Curie ( $3,7 \times 10^{10}$ Zerfälle pro Sekunde)
Da	Dalton
dpm	<i>desintegration per minute</i> (Zerfälle pro Minute)
F	Trockengewichtsfaktor für <i>Corynebacterium glutamicum</i> [0,36 mg/ml]
$n_s$	Brechungsindex
osM	Einheit der Osmolarität (osmol/l)
osmol	Einheit für ein Mol an osmotisch wirksamen Teilchen
ppm	parts per million
sp.T.	spezifische Transportrate
T	Temperatur in Kelvin
$V_w$	partiell molares Volumen des Wassers
$V_z$	spezifisches Zellvolumen

**NATURKONSTANTEN**

$k_B$	Boltzmann-Konstante
$N_A$	Avogadro-Zahl
R	Gaskonstante



# 1. EINLEITUNG

Die vorliegende Arbeit wurde an dem Gram-positiven, unbeweglichen, nicht sporulierenden Bakterium *Corynebacterium glutamicum* durchgeführt [Liebl, 1991]. Dieser Organismus ist als Glutamat-sezernierendes Bakterium von Kinoshita *et al.* (1957) aus dem Boden isoliert worden und hat als Aminosäureproduzent weltweit immense wirtschaftliche Bedeutung erlangt [Krämer, 1994, Leuchtenberger, 1996, Eggeling *et al.*, 1997]. Die Aminosäureproduktion erfolgt durch *batch*-Fermentation und ist mit erheblichen osmotischen Schwankungen für *C. glutamicum* verbunden (anfangs durch hohe Melassezugabe und gegen Ende der Fermentation durch hohe Produktanreicherung im Medium). An Veränderungen der Osmolarität muss sich das Bodenbakterium aber auch in seiner natürlichen Umgebung anpassen können. Die Wahrnehmung dieses Stressfaktors (Osmostress) und die darauf folgende Reaktion des Bakterium war Untersuchung dieser Arbeit.

## Was ist Stress und wie wird er gemessen?

Aus biologischer Sicht gilt für eine einzelne Zelle jede Änderung der Umgebungsbedingungen, die einen signifikanten Wechsel in der Zellphysiologie oder Motorik mit sich bringt, als Stresszustand [Booth, 1999]. Es gibt verschiedene Parameter, deren plötzliche Schwankung Stress auslösen kann, dazu zählen Temperatur, pH, UV-Licht, Redoxpotential [Demple, 1991], Osmolarität, Stickstoffmangel, Wachstumsdichte und Hunger. Die Detektion dieser Stressfaktoren erfolgt über unterschiedliche Sensoren, die die Stressantwort aktivieren. In dieser Arbeit wurde der Mechanismus der Osmostress-Detektion (*osmosensing*) untersucht.

## Was ist Osmostress?

Alle Organismen unterliegen einem osmotischen Stress, wenn die Konzentration der Ionen und Moleküle außerhalb der Zellen des Organismus wesentlich höher oder plötzlich sehr viel niedriger ist als innerhalb. Das Vorhandensein der semipermeablen Zellmembran führt dazu, dass gelöste Teilchen zurückgehalten werden, allerdings die Moleküle des Lösungsmittels (Wasser) relativ leicht hindurchtreten. Das Wasser diffundiert durch die semipermeable Membran stets von der Lösung niedrigerer zu derjenigen höherer Konzentration. Diesen Vorgang nennt man Osmose. Der dabei entstehende Druck, der durch den Zufluss des Wassers entsteht und dem Wasserfluss entgegengerichtet ist, nennt man osmotischen Druck. Der osmotische Druck ist somit abhängig von der Wasseraktivität. Diese steht folgendermaßen (1.1) mit dem osmotischen Druck in Beziehung:

$$\Pi = -(RT/V_w) \ln a_w \quad (1.1)$$

$\Pi$	osmotischer Druck
$R$	Gaskonstante
$T$	Temperatur in Kelvin
$V_w$	partiell molares Volumen des Wassers
$a_w$	Aktivität des Wassers

Teilchen mit dem größten Effekt auf die Wasseraktivität oder der höchsten Konzentration im Teilchengemisch haben somit den größten Einfluss auf den osmotischen Druck. Der osmotische Druck kann also durch die Summe der Konzentrationen der osmotisch wirksamen Teilchen beschrieben werden (1.2), welche man Osmolarität [osM] nennt:

$$\text{Osmolarität} = \sum_i c_i \approx \Pi / RT \quad (1.2)$$

Die Summe der osmotisch wirksamen Teilchen kann allerdings nur berechnet werden. Gemessen wird kann die Osmolalität [osmol/kg], das ist der osmotische Druck in Abhängigkeit von dem Gewicht der Teilchen in der Lösung (1.3). Dieser wird häufig durch Gefrierpunktserniedrigung bestimmt.

$$\text{Osmolalität} = \Pi / RT \quad (1.3)$$

Zwei osmotische Prozesse werden unterschieden: Von hyperosmotischem Stress spricht man, wenn in der Umgebung eine größere Zahl an osmotisch wirksamen Substanzen vorliegt und Wasser aus der Zelle entweicht. Der umgekehrte Prozess, bei dem Wasser in die Zelle einströmt, wird als hypoosmotischer Stress bezeichnet [Csonka, 1989]. Unter isoosmolaren Bedingungen strömt kein Wasser in die Zelle hinein oder aus ihr heraus. Da das Cytoplasma der Zelle allerdings unter normalen Bedingungen ein hochkonzentriertes gelartiges Molekülgemisch darstellt, wird der osmotische Druck durch den entgegengesetzt wirkenden Wanddruck (Turgordruck) kompensiert.

Prokaryoten und einzellige Eukaryoten sind osmotischen Schwankungen der Umgebung direkt ausgesetzt und benötigen passive und aktive Schutzmechanismen zur Regulation

des intrazellulären osmotischen Druckes [Wegmann, 1986; Wood, 1999; Bremer und Krämer, 2000].

### **Hypo- und Hyperosmotischer Stress**

Unter hypoosmotischen Bedingungen muss die Zelle dem steigenden osmotischen Druck in der Zelle durch das einströmende Wasser entgegenwirken, da sie im Extremfall platzen würde. Dazu besitzen viele Prokaryoten und Eukaryoten mechanosensitive Kanäle (*mechanosensitive channels*, Msc), die sich unter diesen Bedingungen öffnen und u.a. akkumulierte kompatible Solute und Ionen herausströmen lassen [Berrier *et al.*, 1992; Schleyer *et al.*, 1993]. Sukharev *et al.* (2001) konnten Hinweise erhalten, dass das Pentamer MscL aus *Mycobacterium tuberculosis*, welches in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist, als Spannungssensor fungiert. Nach einem hypoosmotischen Schock kann der Kanal in der Membran lateral expandieren und öffnet sich durch den fehlenden Gegendruck der Lipiddoppelschicht. In *Escherichia coli* sind drei mechanosensitive Kanäle beschrieben, die sich in ihrer Leitfähigkeit unterscheiden [Berrier *et al.*, 1996]. In *Corynebacterium glutamicum* sind zwei mechanosensitive Kanäle (MscS und MscL) charakterisiert worden, die für den spezifischen Efflux von Glycinbetain und Prolin sowie einen geringen Efflux an Kationen verantwortlich sind. Ein weiterer Kanal wurde noch nicht charakterisiert [Ruffert *et al.*, 1999; Nottebrock, 2000].

Hyperosmotischer Stress verursacht durch ausströmendes Wasser eine Volumenverringerng der Zelle und Erniedrigung des Turgors. Als Antwort haben Zellen einige Strategien entwickelt, dem hyperosmotischen Stress entgegenzuwirken, weil es keine Transportsysteme gibt, mit denen sie Wasser aktiv aufnehmen können. Die häufigste Strategie ist die Aufnahme und/oder Synthese von kompatiblen Soluten. Dies sind Moleküle, die in molaren Konzentrationen noch löslich sind, den Zellstoffwechsel nicht negativ beeinflussen und die Zelle vor Wasserverlust schützen [Galinski und Trüper, 1994; Poolman und Glaasker, 1998]. Neben Kalium und selten auch Natrium als kationischem kompatiblen Solut [Martin *et al.*, 1999] werden alle organischen anionisch oder ungeladenen kompatiblen Solute in folgende Strukturklassen unterteilt: nicht-reduzierende Zucker (Saccharose, Trehalose), Aminosäuren (Glutamat, Glutamin, Prolin), Aminosäurederivate (Peptide, N-acetylierte Aminosäuren), methylierte Aminosäuren (Glycinbetain, Prolinbetain), Tetrahydropyrimidine (Ectoin) und Polyole (Glycerol, Arabitol). In den meisten Eubakterien ist die Akkumulation von Glycinbetain gegenüber den anderen kompatiblen Soluten aufgrund der größten Schutzwirkung bevorzugt. Diese Verbindung steht aus verrotteten Pflanzenmaterialien zur Verfügung und bewirkt die höchste Osmotoleranz und stabilisiert Enzyme sehr effektiv. Der allgemeine Schutz vor

osmotischen Veränderungen wirkt sich auch positiv bei Temperaturschwankungen aus [Yancey *et al.*, 1982].

### **Physikalisch-chemische Auswirkung sich ändernder Osmolaritäten auf die Zelle**

Die physikalisch-chemische Auswirkung wechselnder Osmolaritäten auf Zellbestandteile und ganze Zellen ist noch wenig verstanden. Aus diesem Grund gibt es auch nur Vermutungen, wie Osmolarität von einem Organismus direkt gemessen werden kann. Osmotisch wirksame Substanzen werden als Lösungsmittelbestandteile (*cosolvents*) verstanden: Verbindungen, die das Verhalten des Lösungsmittels (Wasser) signifikant beeinflussen. Die *cosolvents* werden in zwei Klassen eingeteilt. Entweder sie zerstören die Wasserstruktur (chaotrop) oder sie stabilisieren sie (kosmotrop). Der Übergang ist fließend und kann mit dem Hofmeister-Effekt beschrieben werden [Collins und Washabaugh, 1985]. Danach sind Phosphate, Ammonium, Saccharose und Glycerol kosmotrop, Natrium- und Chloridionen nahezu neutral und Thiocyanate und Harnstoff stark chaotrop. Mit der Zerstörung der Wasserstruktur wird gleichzeitig die native Struktur der Proteine beeinflusst. Dabei werden drei verschiedene Lösungsmittel-Reihe unterschieden [Wood, 1999]:

1. *Preferential Exclusion (Preferential Interaction)*: Im Unterschied zu der klassischen Bindungstheorie liegt ein Makromolekül nicht nur in zwei Zuständen vor (ohne gebundenem Liganden oder mit gebundenem Liganden), sondern besitzt sehr viele Ligandenbindungsstellen (*solvent*-Bindungsstellen), die nach Zahl der Bindungen das Makromolekül in verschiedenen Zuständen halten. Die einzelne Bindung ist dabei sehr schwach. Das Solvent beeinflusst die Proteinstruktur durch die unterschiedlich große Zahl an belegten Bindungsplätzen [Timasheff, 1992].
2. *Hydration Changes*: Durch die Kraft der Wasserbindungen wird das Protein in seine Struktur gezwungen. Die Bindungsstellen zum Liganden können vom *solvent* (Wasser) bedeckt werden und somit die Ligandenbindung beeinflussen. Die Konformation eines Proteins ist somit energetisch verschieden in Abhängigkeit der *solvent*- und *cosolvent*-Anwesenheit [Parsegian *et al.*, 1995].
3. *Macromolecular Crowding*: Das Proteinrückgrat ist einer großen Zahl an Makromolekülen aus dem Lösungsmittel ausgesetzt, die schwach und unspezifisch mit dem Protein interagieren. Die Wasseraktivität beeinflusst diese Interaktion und zwingt das Protein in seine native Struktur [Garner und Burg, 1994].

Ein cytoplasmatischer Osmosensor muss diese Effekte detektieren und weiterleiten. Osmosensoren können allerdings auch in die Membran integriert sein und

Lösungsmitteländerungen oder Membranspannung messen (z. B. MscL aus *Mycobacterium tuberculosis*). Hier spielt die Membranzusammensetzung und Struktur des Sensors eine entscheidende Rolle. Die Aggregation einzelner Lipide zu Lipiddoppelschichten wird direkt von der Hydrophobizität des Wassers beeinflusst, welche sich in hoher Ordnung an der Lipiddoppelschicht ausrichtet. Dadurch sind die Lipide einer unilamellaren Schicht bestrebt, so nah zusammenzurücken, dass sich durch die meist voluminösen Kopfgruppen der Lipide die Schicht krümmt. Diese Krümmung wird durch die gegenüberliegende, angelagerte unilamellare Schicht verhindert. Dies führt zur "Frustration" der einzelnen Schichten der Lipiddoppelschicht und zur erzwungenen Ausbildung einer laminaren Schicht. Biologische Membranen sind häufig mit Phospholipiden angereichert, die nur eine geringe Tendenz aufweisen, lamellare Schichten auszubilden (z. B. Phosphatidylethanolamin in *E. coli*). Die "Frustration" der Lipiddoppelschicht wird in der Stärke des lateralen Druckes sichtbar und beeinflusst so Membranproteine [Marsh, 1996].

### **Osmosensoren und ihre Strukturen**

Die Weiterleitung des Osmosignals kann auf Expressionsebene und Aktivitätsebene erfolgen. Auf Expressionsebene erfolgt die Transkription der Gene mit Hilfe von osmotisch regulierten Transkriptionsfaktoren. Eine große Zahl bekannter Sensoren mit Transkriptionsregulation ist strukturverwandt und wird in der Gruppe der Zweikomponenten-Regulationssysteme zusammengefasst [Alex und Simon, 1994]. Der Sensor wird durch Autophosphorylierung aktiv und gibt das Signal über Phosphorylierung an den Regulator weiter. Der membrangebundene Sensor besteht aus zwei Modulen, einem N-terminalen Rezeptor und einem C-terminalen Transmitter. Die Rezeptoren unterschiedlicher Sensoren sind aufgrund unterschiedlicher Signale sehr verschieden aufgebaut. Der Regulator ist ein cytosolisches Protein und besteht ebenfalls aus zwei Modulen, dem konservierten N-terminalen Empfänger und einem variablen C-terminalen Regulator. Sensoren dieser Art scheinen ubiquitär in allen Prokaryoten vorhanden. In *E. coli* sind aufgrund der DNA-Sequenz über 30 verschiedene Sensor-Regulator-Paare identifiziert worden.

Die osmosensorischen Zweikomponenten-Systeme EnvZ-OmpR und KdpD-KdpE aus *E. coli* sind gut untersucht und detektieren hyperosmotischen Stress.

EnvZ ist ein Protein der inneren Membran, bestehend aus einer kleinen (15 AS) cytoplasmatischen N-terminalen Domäne, zwei Membrandomänen mit einer langen periplasmatischen Schleife (114 AS) und einer sehr langen C-Extension (321 AS) [Jung *et al.*, 2001, im Druck]. Die C-Extension von EnvZ enthält die katalytische ATP-Bindedomäne und das konservierte Histidin (His-243), welche unter hyperosmotischen



Bedingungen autophosphoryliert wird. Nach Autophosphorylierung wird der Regulator OmpR phosphoryliert. OmpR~P ist ein Transkriptionsfaktor, der stromaufwärts der Promotorregion der Gene *ompF* und *ompC* sequentiell bindet. Die Gene *ompF* und *ompC* kodieren für Porine der äußeren Membran. Unter hypoosmolaren Bedingungen liegt EnvZ dephosphoryliert vor und dephosphoryliert OmpR. Unter hyperosmotischen Bedingungen ist es umgekehrt. Das Verhältnis OmpR zu OmpR~P entscheidet über die Synthese von OmpF oder OmpC. [Qin *et al.*, 2001]. Mit NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die ATP-Bindedomäne von EnvZ eine  $\alpha/\beta$ -Sandwich-Falte bildet [Tanaka *et al.*, 1998]. Vor der ATP-Bindedomäne (223. - 289. AS) bildet sich ein Vier-Helix-Bündel aus zwei identischen Helix-Turn-Helix-Motiven aus [Tomomori *et al.*, 1999]. Mit Hilfe dieser C-terminalen Domäne katalysiert EnvZ die Phosphorylierung von OmpR und die Dephosphorylierung von OmpR~P. Wie EnvZ die veränderte Osmolarität misst, war zu Beginn der hier vorgestellten Untersuchungen noch völlig unklar.

Die Sensorkinase KdpD (894 AS) besteht aus vier Transmembranhelices und zwei cytoplasmatischen Domänen. KdpD ist unabhängig von anderen Faktoren in der Lage, hyperosmotische Bedingungen und Kaliumlimitation zu detektieren [Jung *et al.*, 1997]. Dabei scheint die N-terminale Domäne die wichtigste Rolle für die Regulation von KdpD zu spielen. Die N-Extension ist 395 AS lang und enthält das Walker A- und B-Bindemotiv für die ATP-Bindung. Bis auf einen 17 AS langen Abschnitt in der Nähe des Walker A-Motivs besteht die Domäne aus hydrophilen AS. Die ATP-Bindung und Kinaseaktivität ist von negativ geladenen Phospholipiden abhängig [Heermann *et al.*, 2000]. Drei Domänen sind für die Signalaufnahme wichtig: 1. Ein Cluster positiv geladener Arginine nahe der vierten Transmembranhelix, 2. die vier Transmembrandomänen zur richtigen Positionierung der N-terminalen zur C-terminalen Domäne, 3. die Aminosäuren 12 - 128 für die Phosphataseaktivität. KdpD phosphoryliert den Regulator KdpE und initiiert damit die Expression des Operons *kdpFABC* zur Synthese des Kaliumionenaufnahmesystems Kdp. Deletionen der ersten 128 AS der N-terminalen Domäne führten zur Deregulation der Phosphataseaktivität von KdpD. K<sup>+</sup>-Limitierung konnte ebenfalls nicht mehr wahrgenommen werden. Damit stellt die N-terminale Domäne den Sensor dar. Auch hier war zu Beginn der Arbeit noch kein Sensormechanismus für wechselnde Osmolaritäten bekannt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Kaliumlimitierung und hyperosmotische Bedingungen KdpD aktivieren [Sugiura *et al.*, 1994].

In Eukaryoten, z. B. in Hefen [Maeda *et al.*, 1994] und höheren Pflanzen [Imamura *et al.*, 1998] sind ebenfalls Sensorkomponenten gefunden worden. In der Hefe

*Saccharomyces cerevisiae* wird ein osmotisches Signal mit zwei dieser Sensoren (Sho1p und Sln1p) wahrgenommen und anschließend über einen MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalweg weitergeleitet. Der gesamte Signalweg führt zur Expression der Glycerol-Synthese-Gene und wird als HOG (*high-osmolarity glycerol response*)-Kaskade zusammengefasst [Rep *et al.*, 2000]. Glycerol ist das häufigste kompatible Solut in Hefen. Für den Osmosensor Sho1p werden vier Transmembranhelices vorhergesagt, die aufgrund ihrer hohen Identität im gleichen Protein verschiedener Organismen (*Candida utilis*, *Kluyveromyces lactis* und *S. cerevisiae*) mit der Sensorfunktion zu tun haben [Siderius *et al.*, 2000]. Zusätzlich besitzt das Protein eine kurze N-terminale (31 AS) und eine lange (222 AS) C-terminale Domäne. Charakteristisch für die C-terminale Domäne ist eine SH3-Domäne im C-terminalen Bereich, die wahrscheinlich mit der Prolin-reichen Domäne von Pbs2p interagiert.

### **Osmotisch regulierte Transporter mit Sensorfunktion in Prokaryoten**

Die meisten Prokaryoten besitzen zusätzlich noch Osmosensoren mit Transportfunktion für kompatible Solute [Krämer, 1994; Bremer und Krämer, 2000]. Für drei dieser osmotisch regulierten Transportsysteme (ProP aus *E. coli*, BetP aus *C. glutamicum* und OpuA aus *Lactococcus lactis*) konnte gezeigt werden, dass sie unabhängig von anderen Proteinen im Proteoliposomen-System hyperosmotische Bedingungen detektieren können [Racher *et al.*, 1999; Rübenhagen *et al.*, 2000; van der Heide und Poolman, 2000].

OpuA (408 AS) aus *L. lactis* [van der Heide und Poolman, 2000] gehört zur Familie der ABC-Transporter. Die ABC-Transporter arbeiten als primäre Transporter, indem sie die Energie zum Transport durch ATP-Hydrolyse aufbringen. OpuA ist sensitiv gegenüber osmotischem Schock und besteht aus fünf Proteindomänen: einer extrazellulären Bindedomäne für das Substrat, zwei ATP-Bindeuntereinheiten und zwei integralen Membranuntereinheiten. Unter hyperosmotischen Bedingungen wird der Transporter auf der Ebene der Expression und der Aktivität reguliert und transportiert Glycinbetain in die Zelle. Untersuchungen an OpuA im rekonstituierten System haben ergeben, dass der Transporter durch Erhöhung der äußeren Osmolarität sowohl mit ionischen als auch mit nichtionischen Komponenten aktivierbar ist. Welche Proteinstrukturanteile für die Sensorfunktion verantwortlich sind, ist noch völlig unklar.

Der Transporter ProP (500 AS) aus *E. coli* [Culham *et al.*, 1993] gehört zur *major facilitator superfamily* (MFS-Familie) und besteht aus zwölf transmembranen Helices mit N- und C-terminalen cytoplasmatischen Domänen. Das Gen wird konstitutiv in *E. coli* exprimiert. Auf der Ebene der Aktivität ist ProP osmoreguliert und transportiert im Symport mit H<sup>+</sup> Prolin, Glycinbetain, Prolinbetain, Ectoin und strukturverwandte Moleküle. Unter niedrigosmolaren Bedingungen ist der Transporter völlig inaktiv und wird in 0,5 M NaCl

maximal aktiviert. Für die Wahrnehmung äußerer hyperosmotischer Bedingungen wird auch hier nur das Protein selber in einer Membranumgebung benötigt [Racher *et al.*, 1999]. Zur vollständigen Aktivierung von ProP sind zur Erzeugung des osmotischen Gradienten membranimpermeable Verbindungen nötig. Membranpermeable Verbindungen, wie Glycerol, Harnstoff, Polyethylenglycole (PEG) mit geringer Kettenlänge (PEG 62 und PEG 106) aktivierten nicht. Somit scheint das Schrumpfen der Proteoliposomen ProP zu aktivieren. Allerdings konnte ProP durch die membranpermeablen Verbindungen PEG 150 und PEG 200 auch aktiviert werden [Racher *et al.*, 2001]. Eine cytoplasmatische Ionenabhängigkeit wurde noch nicht untersucht.

BetP, aus der zweiten Gruppe der osmotisch regulierten sekundären Transporter, der Betain-Carnitin-Cholin-Transporter-(BCCT)-Familie, wird auf der Ebene der Expression und der Aktivität osmoreguliert. Dieser Transporter wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht und wird weiter unten beschrieben.

Weitere osmotisch regulierte Transporter wurden noch nicht näher auf ihre osmosensorischen Eigenschaften untersucht. Dazu zählen die ABC-Transporter ProU (*E. coli*), OpuA und OpuC (*Bacillus subtilis*). Weitere wurden in *Rhizobium meliloti* und *Listeria monocytogenes* gefunden. Die sekundären Transporter werden alle in zwei übergeordnete Superfamilien eingeteilt [Saier, 1994]: Die *major facilitator superfamily* (MFS-Familie) enthält die osmotisch aktiven Carrier ProP (Substrat/H<sup>+</sup>-Symporter) aus *E. coli* und OusA aus *Erwinia chrysanthemi* [Gouesbet *et al.*, 1996]. Eine zweite Gruppe bildet die Betain-Carnitin-Cholin-Transporter-(BCCT)-Familie bestehend aus dem Cholin-Transporter BetT aus *E. coli*, OpuD aus *B. subtilis* und BetP sowie EctP aus *C. glutamicum*. Ein weiterer osmotisch regulierter Carrier OpuE aus *B. subtilis* wird keiner dieser Familien zugeordnet [von Blohn *et al.*, 1997].

### **Zeitliche Abfolge der zellulären Antwort auf hyperosmotischen Stress**

Hinsichtlich der zeitlichen Antwort auf einen hyperosmotischen Schock unterscheiden sich Gram-negative von Gram-positiven Bakterien. Am besten untersucht sind dabei die Organismen *E. coli* und *B. subtilis* [Kempf und Bremer, 1998].

In *E. coli* werden als erste Antwort auf einen hyperosmotischen Schock Kaliumionen in der Zelle akkumuliert. Die Aufnahme erfolgt mit den Transportsystemen Kdp, Kup und Trk. Zum Ladungsausgleich werden Putrescin und Protonen heraustransportiert [Dinnbier *et al.*, 1988]. Gleichzeitig beginnt die Aufnahme und *de novo*-Synthese von Glutamat [Cayley *et al.*, 1991; McLaggan *et al.*, 1994]. Kaliumionen ersetzen dabei teilweise Putrescin als Gegenion zur negativ geladenen DNA. Die Aufnahme von Glycinbetain oder Prolin (mit ProU und ProP) kann zeitgleich erfolgen, ist allerdings nicht so schnell

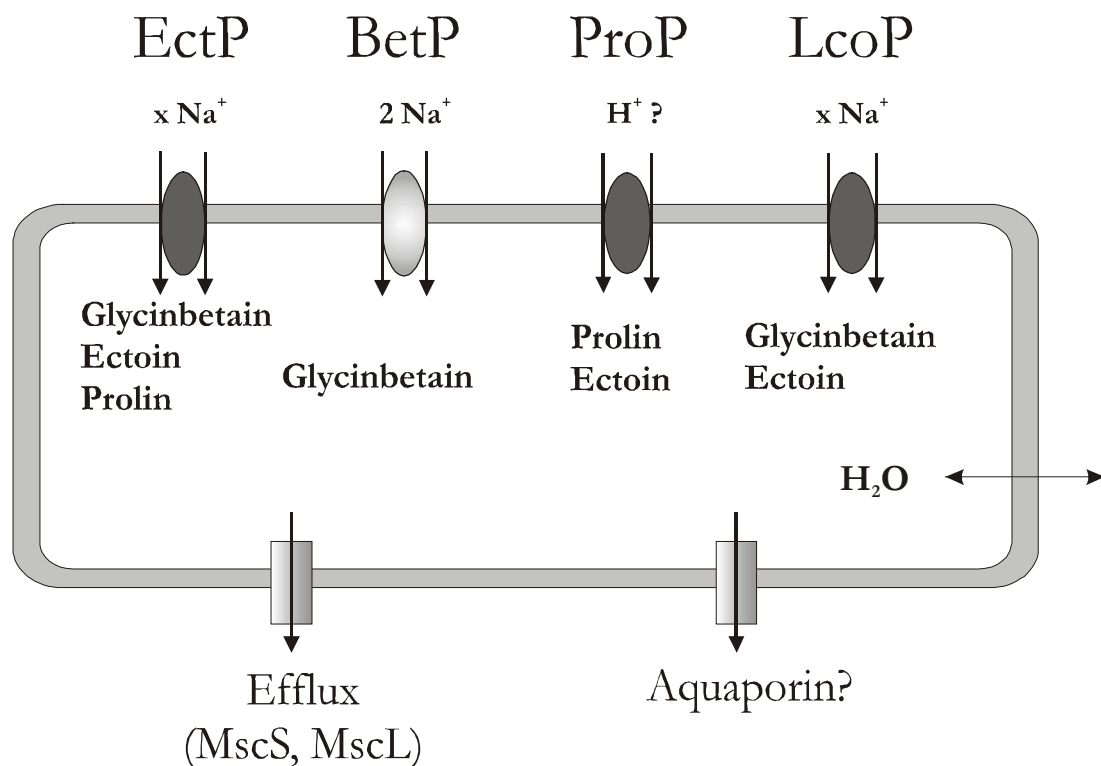
und damit der nachfolgenden (zweiten) Phase zuzuordnen. Anschließend werden kompatible Solute synthetisiert. Durch Glycinbetain, synthetisiert aus Cholin, wird das Cytoplasma effektiver rehydriert und die Zellstruktur und Physiologie weniger belastet. Dadurch kann Kalium und Glutamat aus der ersten Phase ersetzt werden [Dinnbier *et al.*, 1988]. Für die volle Aktivität von ProP aus *E. coli* und *S. typhimurium* ist allerdings exogenes Kalium notwendig [Wood, 1999]. In Abwesenheit von kompatiblen Soluten und unter Stickstoffmangel wird in *E. coli* Trehalose als wichtigstes kompatibles Solut synthetisiert und ersetzt Kaliumglutamat aus der ersten Phase.

Das Gram-positive Bakterium *B. subtilis* akkumuliert in erster Linie Prolin [Measures, 1975]. *B. subtilis* enthält unter isoosmolaren Bedingungen schon eine hohe Kaliumkonzentration (bis 400 mM) und einen hohen Aminosäurepool (Glutamat). Dies erklärt auch den unterschiedlichen Turgordruck bei Gram-negativen (3-5 bar) und Gram-positiven Bakterien (20 bar) [Whatmore und Reed, 1990; Whatmore *et al.*, 1990]. Auch in diesem Organismus erfolgt die erste Anpassung durch die Akkumulation von Kaliumionen, welche essentiell für die Aufrechterhaltung des Turgors sind. Das Gegenion zu Kalium ist bis heute nicht bekannt. Im Gegensatz zu *E. coli* steigt die Glutamatkonzentration in *B. subtilis* nur langsam nach einem hyperosmotischen Schock. Prolin und Glycinbetain werden sowohl durch Synthese als auch durch Aufnahme akkumuliert und für Prolin sind Steigerungen von einem Basalwert von 16 mM auf über 1 M beschrieben [Kempf und Bremer, 1998]. Die Aufnahme dieser und vieler weiterer kompatibler Solute erfolgt mit drei ABC-Transportern OpuA/B/C und zwei sekundären Carriern OpuD/E.

### **Die Antwort von *C. glutamicum* auf hyperosmotischen Stress**

Für *C. glutamicum* ist unter hyperosmotischen Bedingungen die Akkumulation von Ectoin, Glycinbetain, Prolin und Trehalose beschrieben [Bremer und Krämer, 2000]. Synthetisiert werden Prolin und Trehalose. Eine Kaliumantwort wurde noch nicht beobachtet. *C. glutamicum* besitzt im Gegensatz zu *B. subtilis* und *E. coli* keine ABC-Transporter. Dafür enthält er fünf sekundäre Carrier zur Aufnahme von kompatiblen Soluten, von denen vier osmotisch reguliert werden (**Abb. 1.1**). Mit diesen Transportern werden Glycinbetain, Ectoin und Prolin aufgenommen. Auf Expressionsebene werden BetP und ProP durch Anstieg der externen Osmolalität reguliert, wohingegen EctP konstitutiv exprimiert wird [Peter *et al.*, 1998b; Krämer, unveröffentlichte Ergebnisse]. Auf Aktivitätsebene werden BetP, EctP und ProP reguliert. LcoP wurde noch nicht näher untersucht. Der hochaffine Na<sup>+</sup>-gekoppelte Glycinbetain-Transporter BetP wurde intensiv biochemisch untersucht [Farwick *et al.*, 1995; Peter *et al.*, 1998a] und das zugehörige Gen charakterisiert [Peter *et al.*, 1996]. Für BetP wie auch EctP werden 12 transmembrane Helices mit

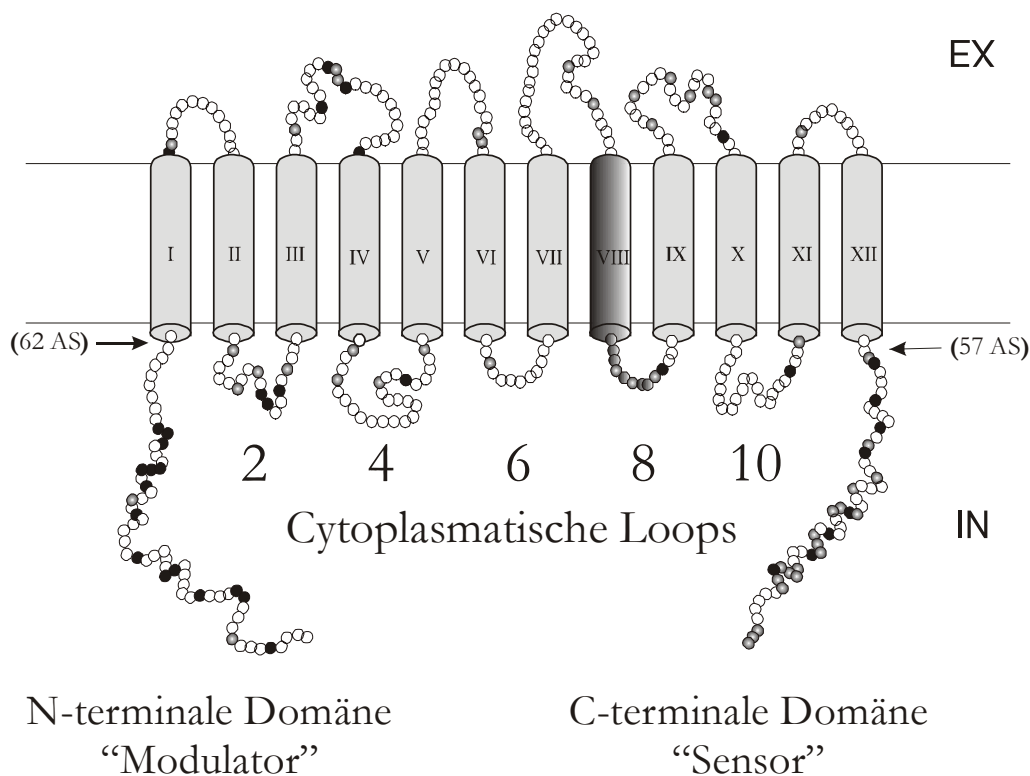
unterschiedlich langen N- und C-terminalen Domänen vorhergesagt. Beide Transporter (37 % Identität) werden zusammen mit OpuD aus *B. subtilis* (40 % Identität) sowie CaiT und BetT aus *E. coli* (28 % bzw. 36 % Identität) in der BCCT-Familie (Betain-Carnitin-Cholin-Transporter) zusammengefaßt [Paulsen *et al.*, 1998]. BetP transportiert nur Glycinbetain ( $K_M = 8,6 \mu\text{M}$ ), wohingegen EctP auch Ectoin und Prolin im Symport mit Natriumionen aufnimmt. Die genannten Transporter werden auch in der SSS- (*sodium solute/symporter*)-Superfamilie zusammengefasst [Reizer *et al.*, 1994].



**Abb. 1.1** Schematische Darstellung von *C. glutamicum*. Dargestellt sind die vier osmotisch regulierten Transporter EctP, BetP, ProP und LcoP mit ihren Substraten. Der Efflux von kompatiblen Soluten erfolgt durch mechanosensitive Kanäle (MscS, MscL).

Der Transporter BetP (595 AS; **Abb. 1.2**) ist unter isoosmolaren Bedingungen in *C. glutamicum* fast völlig inaktiv. Das Aktivitätsoptimum liegt im Wildtyp bei einer Osmolalität von 1,3 osmol/kg. In *E. coli* liegt das Transportoptimum bei 0,6 osmol/kg. Interessanterweise konnten in Proteoliposomen die gleiche Verschiebung der Aktivitätsoptima mit *E. coli*-Lipiden und durch Zugabe von Phosphatidylglycerol beobachtet werden [Rübenhagen *et al.*, 2000]. In *C. glutamicum* macht Phosphatidylglycerol den Hauptlipidbestandteil (70 - 80 %) der Phospholipidzusammensetzung der Membran aus [Hoischen und Krämer, 1990]. Peter *et al.* (1998a) konnte zeigen, dass die N- und C-terminalen cytoplasmatischen Domänen von BetP (N-Extension: 62 AS; C-Extension:

57 AS) für die Wahrnehmung und die Einstellung des Aktivitätsoptimums verantwortlich sind. Deletionen der N-terminalen Domäne (60 AS) führte immer zu einer Verschiebung des Aktivitätsoptimums hin zu höherer externer Osmolarität. Wohingegen die Deletion der kompletten C-terminalen Domäne (52 AS) zur Inaktivierung von BetP in *E. coli* führte; in *C. glutamicum* aber war BetP mit dieser Deletion aktiv, aber dereguliert [Peter, 1997]. Weitere Mutanten mit teilweiser Verkürzung der C-terminalen Domäne zeigten mit zunehmender Verkürzung zunehmende Veränderungen. Der Verlust der letzten 12 Aminosäuren führte zu einer Verschiebung des Aktivitätsoptimums in den Bereich niedriger Osmolaritäten. Die Deletion von 23 C-terminalen Aminosäuren führte zu einer erniedrigten Affinität zum Cosubstrat Natrium und zur Aufhebung der Osmoregulation. Durch die C-terminale Verkürzung von 32 Aminosäureresten wurde zusätzlich die Affinität zu Glycinbetain erniedrigt [Peter, 1997]. Die C-terminale Domäne bildet somit den Sensor für das unbekannte hyperosmotische Schock-Signal und die N-terminale Domäne moduliert das Signal.



**Abb. 1.2** Schematische Darstellung des Topologiemodells von BetP. Die Transmembrandomänen sind mit I - XII gekennzeichnet. Die cytoplasmatischen Domänen sind mit den kompletten Deletionen dargestellt (62 AS für die N-Extension und 57 AS für die C-Extension). Die cytoplasmatischen Schleifen (*loops*) sind von 2 - 10 durchnummeriert. Positiv geladene Aminosäuren sind grau, negativ geladene schwarz dargestellt. Die Helix VIII und die anschließende Schleife 8 sind aufgrund der höchsten Identität zu anderen Transportern der BCCT-Familie grau hinterlegt.

Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Struktur beider terminaler Extensionen. Zur Signalerfassung und Übermittlung muss von Strukturänderung und Interaktion der C-terminalen Domäne mit weiteren Komponenten des Transporters ausgegangen werden. Diese Interaktionen sollten im Rahmen dieser Arbeit detektiert und damit die Funktion des *osmosensing* auf molekularer Ebene besser verstanden werden.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Bakterienstämme, Plasmide, Nährmedien und Chemikalien

#### 2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in **Tab. 2.1** und **Tab. 2.2** dargestellt.

**Tab. 2.1** Verwendete Bakterienstämme

Stamm	relevante Eigenschaften	Herkunft/Literatur
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		
ATCC 13032	Wildtyp	Abe <i>et al.</i> , 1967
DHPF	$\Delta betP \Delta ectP \Delta lcoP \Delta proP \Delta putP$	R. Steger, S. Morbach
<i>Escherichia coli</i>		
ER2566	F <sup>-</sup> $\lambda$ - <i>fhuA2</i> [Ion] <i>ompT</i> <i>lacZ::T7 gene1</i> <i>gal</i> <i>sulA11</i> $\Delta(mcrC-mrr)114::IS10$ $R(mcr-73::miniTn10--TetS)2$ $R(\zeta gb-210::Tn10)(TetS)$ <i>endA1</i> [ <i>dcm</i> ]	Chong <i>et al.</i> , 1998
DH5 $\alpha$ . <i>mcr</i>	<i>supE44</i> $\Delta lacZYA-argF$ U169 $\Phi 80 \Delta lacZ \Delta M15 mcrA$ <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i> <i>deoR</i> $\Delta(mmr$ <i>hsdRMS mcrBC)</i> .	Grant <i>et al.</i> , 1990



**Tab. 2.2** Verwendete Plasmide

Vektor	relevante Eigenschaften	Herkunft/Literatur
pTYB2	7,2 kb, <i>colE1ori lacI</i> T7-Promotor MCS SceVMAIntein CBD <i>amp<sup>R</sup></i>	Evans <i>et al.</i> , 1998
pTYB2 <i>c-bet</i>	7,45 kb mit 0,18 kb <i>SmaI-NdeI</i> - Fragment C-terminal von <i>betP</i>	diese Arbeit, S. Morbach
pTYB2 <i>c-bet+5</i>	7,46 kb mit 0,195 kb <i>SmaI-NdeI</i> - Fragment C-terminal von <i>betP</i>	diese Arbeit, S. Morbach
pTYB2 <i>c-bet+10</i>	7,46 kb mit 0,21 kb <i>SmaI-NdeI</i> - Fragment C-terminal von <i>betP</i>	diese Arbeit, S. Morbach
pTYB2 <i>c-bet+15</i>	7,47 kb mit 0,225 kb <i>SmaI-NdeI</i> - Fragment C-terminal von <i>betP</i>	diese Arbeit, S. Morbach
pTYB2 <i>c-bet+20</i>	7,47 kb mit 0,24 kb <i>SmaI-NdeI</i> - Fragment C-terminal von <i>betP</i>	diese Arbeit, S. Morbach
pTYB2 <i>n-bet</i>	7,47 kb mit 0,18 kb <i>SmaI-NdeI</i> - Fragment N-terminal von <i>betP</i>	diese Arbeit, S. Morbach
pTYB2 <i>c-cys</i>	7,45 kb mit 0,18 kb <i>SmaI-NdeI</i> - Fragment C-terminal von <i>betP</i> + cys	diese Arbeit, S. Ruffert
pTYB2 <i>n-cys</i>	7,47 kb mit 0,18 kb <i>SmaI-NdeI</i> - Fragment N-terminal von <i>betP</i> + cys	diese Arbeit, S. Ruffert
pDrive	3,85 kb <i>amp<sup>R</sup> kan<sup>R</sup> Plac lacZ'-3'-U</i>	Qiagen GmbH, Hilden
pDrive <i>c-bet-trp</i>	4,03 kb mit 0,18 kb <i>SmaI-NdeI</i> - Fragment C-terminal von <i>betP</i> + trp	diese Arbeit
pTYB2 <i>c-bet-trp</i>	7,46 kb mit 0,18 kb <i>SmaI-NdeI</i> - Fragment C-terminal von <i>betP</i> + trp	diese Arbeit

### 2.1.2 Nährmedien und Kulturbedingungen

Alle *E. coli*-Stämme wurden jeweils bei 37 °C, sowie alle *C. glutamicum*-Stämme jeweils bei 30 °C angezogen. Die Stammhaltung und Vorkultivierung der Zellen erfolgte in Komplexmedien wie „Brain Heart Infusion“ (BHI)- oder „Luria Bertani“ (LB)-Medium (Sambrook *et al.*, 1989).

#### Minimalmedien

Zur Untersuchung der Antwort auf osmotischen Stress wurde *C. glutamicum* in Minimalmedium kultiviert. Dazu wurden zwei osmotisch unterschiedliche Minimalmedien verwendet:

- ⇒ MMI-Medium (0,4 osmol/kg) Peter, 1997
- ⇒ CgXII-Medium (1,1 osmol/kg) Keilhauer *et al.*, 1993

#### SOC-Medium

Zur Transformation von *E. coli* wurde SOC-Medium verwendet. Dieses besteht aus (250 ml): 5 g Trypton, 1,25 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl und 625 µl 1 M KCl.

Nach dem Autoklavieren werden 1,25 ml sterile 2 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung und 0,4 % Glucose zugegeben.

#### Medienzusätze

Zur Selektion von antibiotikaresistenten Stämmen wurde den autoklavierten und auf 50 °C abgekühlten Medien sterilfiltriertes Carbenicillin zugegeben (Endkonzentration 50 µg/ml). Zur Induktion der plasmidkodierte Genexpression erfolgte die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 50 µM).

#### Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte auf LB-Platten, welche nach eintägiger Inkubation bei jeweils optimaler Temperatur der Organismen bei 4 °C aufbewahrt wurden. Dauerkulturen wurden aus 1,5 ml Kultursuspension hergestellt. Dazu wurde das Medium entfernt und das Pellet in 500 µl Vollmedium und 500 µl Glycerin resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### 2.1.3 Chemikalien

Sofern nicht in der **Tab. 2.3** angegeben, wurden Chemikalien der Firma Merck AG, Darmstadt und Biochemikalien von Boehringer, Mannheim und Difco-Laboratories (Detroit, Mich., USA) verwendet.

**Tab. 2.3** Verwendete Chemikalien

Substanzname	Firma
[ <sup>14</sup> C]-Cholin	Amersham Pharmacia Biotech., Freiburg
Glycinbetain	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
IPTG	Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe
DTT	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Complete®-EDTAfree	Roche Diagnostics, Mannheim
Carbenicillin	Carl Roth GmbH+Co., Karlsruhe
[ <sup>14</sup> C]-Taurin	Amersham Pharmacia Biotech., Freiburg
<sup>3</sup> H <sub>2</sub> O	Amersham Pharmacia Biotech., Freiburg
Rotiscint®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

## 2.2 Chemische Synthese untersuchter Peptide

Verkürzungen der C-terminalen Domäne und die cytoplasmatischen Schleifen 2, 4, 6, 8 und 10 von BetP, sowie die Schleife 8 in zufälliger Aminosäureabfolge (*random 8*), wurden für weitere Untersuchungen im Reinheitsgrad *crude extract* chemisch synthetisiert (INTERACTIVA Biotechnologie GmbH, Ulm). Die Verkürzung C-12 beinhaltet die letzten 12 Aminosäuren der C-terminalen Domäne auf der C-terminalen Seite. Die Verkürzung C-21 enthält von der C-terminalen Seite aus die letzten 21 Aminosäuren und die Verkürzung C-35 besteht aus den 35 Aminosäuren der C-terminalen Domäne von der N-terminalen Seite aus. Die Aminosäuresequenz ist in **Tab. 2.4** angegeben. Zum Vergleich sind die Sequenzen der vollständigen C-terminalen Domäne und der N-terminalen Domäne in **Tab. 2.5** dargestellt.

**Tab. 2.4** Chemisch synthetisierte Peptide

Peptidbezeichnung	Aminosäuresequenz
C-12	NH <sub>2</sub> -RERKASGAGKRR-COOH
C-21	NH <sub>2</sub> -KRELAARKRRRERKASGAGKRR-COOH
C-35	NH <sub>2</sub> - VKDLSNDVIYLEYREQQRFNARLARERRVHNEHRK- COOH
Schleife 2	NH <sub>2</sub> -CKFGTIRLGRIDEAPEFRTVS-COOH
Schleife 4	NH <sub>2</sub> -CRVGRKQLLSSAFVPLIGEKGAEGLGKL- COOH
Schleife 6	NH <sub>2</sub> -CGKGIQYLSNAN-COOH
Schleife 8	NH <sub>2</sub> -CISRGRSIREFIL-COOH
Schleife 10	NH <sub>2</sub> -CSASTVMGTMSQHGQLEANK-COOH
<i>random</i> 8	NH <sub>2</sub> -LCIIESGRSRIRF-COOH

**Tab. 2.5** Heterolog exprimierte Peptide

Peptidbezeichnung	Aminosäuresequenz
C-Extension pI = 11,33; 6749,7 Da	NH <sub>2</sub> - VKDLSNDVIYLEYREQQRFNARLARERRVHNEHRK RELAARKRRRERKASGAGKRR-COOH
N-Extension pI = 3,61; 6707,3 Da	NH <sub>2</sub> - MTTSDPNPKPIVEDAQPEQITATEELAGLLENPTNL EGKLADAEIIIILEGEDTQASLNWSV-COOH

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde 1983 von K. B. Mullis entwickelt und ermöglicht die Amplifikation selektierter DNA-Abschnitte. Die

hierzu verwendete DNA-Polymerase bedient sich einzelsträngiger DNA als Matrize für die Synthese eines Komplementärstranges. Um die doppelsträngige DNA in ihre Tochtereinzelstränge zu überführen, wird im Reaktionsansatz die Hitzedenaturierung durchgeführt. Diese kann, je nach GC-Gehalt der zu amplifizierenden Sequenz, zwischen 94 °C und 98 °C liegen. Hiernach wird ein *Annealing*-Schritt durchgeführt, der es den Primern ermöglicht, sich an die ausgewählte DNA-Sequenz zu lagern. Die Synthese des komplementären DNA-Abschnittes durch die Polymerase erfolgt bei 72 °C. Die Abfolge von Denaturierung, Annealing und Synthese wird bis zu 30 mal wiederholt, wodurch die Zielsequenz selektiv exponentiell angereichert wird. Für jede PCR sind, in Abhängigkeit von der zu amplifizierenden Sequenz und den Primern, spezifische Temperaturen, eine geeignete Ionenkonzentration sowie eine ausreichende Menge an freien dNTPs Voraussetzung für eine erfolgreiche Amplifikation.

Zur Amplifizierung der DNA wurden Thermocycler der Firma Eppendorf (Hamburg) oder der Firma Applied Biosystems verwendet. Ein typischer 50 µl Ansatz hatte folgende Zusammensetzung: 0,1 pM Plasmid-DNA, je 5 µM *sense* und *anti-sense* Primer (**Tab. 2.6**), je 10 mM dNTPs, 10 mM Tris, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, bei pH 8,3 (Reaktionspuffer der Firma Roche, Diagnostics). Die Durchführung der PCR wurde nach folgendem Temperaturprogramm gestaltet (30 Zyklen):

Denaturierung	94 °C (30 sec)
Annealing	55 °C (30 sec)
Elongation	72 °C (30 sec)

**Tab. 2.6** Verwendete Primer

Primer	Sequenz
<i>sense</i> Primer (cbettrp)	5'-CCCGGGCCATCGACGCTTCCCCGCGCC-3'
<i>anti-sense</i> Primer (c-impact-1)	5'-CATATGGTCAAGGACTTAAGC-3'

### 2.3.2 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der mittels Restriktionsendonukleasen gespaltenen DNA und DNA aus PCR-Ansätzen erfolgte über Agarosegele in 1 % TAE-Puffer [Sambrook *et al.*, 1989]. Die Agarosekonzentration des Gels betrug 0,8 %. Fragmente mit einer Größe unter 1000 bp

wurden in 2 % NuSieve®-Agarose-Gelen aufgetrennt. Die Anfärbung der DNA erfolgte durch 10 minütige Inkubation der Agarosegele in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (100 mg/l). Mit Hilfe eines UV-Transilluminators wurde das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid angeregt und durch Fluoreszenz sichtbar gemacht. Die Größe der einzelnen DNA-Fragmente wurde durch Vergleich eines parallel aufgetragenen Größenstandards aus Lambda-DNA, geschnitten mit *Bst*EII, bestimmt (bei kleineren Fragmenten wurde ein 100 bp Standard (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) verwendet).

### **2.3.3 Isolierung und Reinigung von DNA**

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde die Methode der alkalischen Lyse (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979) verwendet. Hierzu wurden je 5 ml einer LB-Flüssigkultur über Nacht bei 37 °C angezogen und dann mit Hilfe des GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Braunschweig) die Plasmid-DNA aus den Zellen isoliert. Falls nicht anders angegeben wurde die DNA in 50 µl sterilem Wasser eluiert.

Zur Isolation und Reinigung von DNA in größeren Mengen wurden 100 ml LB-Flüssigkultur über Nacht bei 37 °C angezogen und mit Hilfe des Qiafilter™ die Zellen in Plasmid Midi Kit (Qiagen GmbH, Hilden) aufgearbeitet.

### **2.3.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Isolierung von DNA-Fragmenten zur Ligation erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung (siehe 2.3.2) mit Hilfe des Gel-Extraktion-Kits (Qiagen GmbH, Hilden). In diesem Verfahren wird die Agarose zunächst mit einer 7 M Natriumhypochlorid-Lösung solubilisiert und die DNA in einem zweiten Schritt an Silicamembranen gebunden. Nach mehreren Waschschritten wird die DNA mit 50 µl sterilem Wasser wieder von der Matrix abgelöst.

### **2.3.5 Rekombination von DNA**

Zur DNA-Rekombination wurde nach Sambrook *et al.* (1989) vorgegangen. Die Ligation erfolgte mit Hilfe des Qiagen® PCR Cloning Kits (Qiagen GmbH, Hilden).

### **2.3.6 Transformation von *E. coli***

Zur Transformation von *E. coli* wurden 200 µl kompetente Zellen des Stammes DH5α*mcr* oder ER2566 auf Eis aufgetaut und mit 5 µl Plasmid (12,5 ng) versehen. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein kurzer Hitzeschock für 30 s bei 42 °C. Nach Zugabe von 400 µl SOC-Medium konnten die Zellen 1 h bei 37 °C regenerieren und

wurden anschließend auf LB-Agarplatten mit Carbenicillin (50 µg/ml) ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden nach der Vorschrift zur Herstellung superkompetenter Zellen durchgeführt [Inoue *et al.*, 1990].

## 2.4 Biochemische Methoden und Peptidisolation

### 2.4.1 Anzucht der Zellen

#### 2.4.1.1 Anzucht im 500 ml-Maßstab

Zur Reinigung der N- oder C-terminalen Domäne von BetP wurden deren codierende Sequenzen als Fusionsgene auf dem Vektor pTYB2 in *E. coli* ER2566 überexprimiert. Hierzu wurden 500 ml Hauptkultur mit einer OD von 0,1 aus einer LB-Vorkultur angeimpft. Die Hauptkultur wurde bei 20 °C und 110 rpm inkubiert. Die Genexpression wurde bei einer OD von 0,5 mit 50 µM IPTG induziert. Die Ernte der Zellen erfolgte nach Wachstum über Nacht. Dabei wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 10.000 rpm, 10 min, 4 °C (Avanti J25, Rotor JLA 10.500, Beckman Coulter Inc., Unterschleißheim-Lohhof) isoliert. Nach einem anschließenden Waschschriff mit 0,9 % NaCl wurden die Zellen durch 20 minütige Zentrifugation bei 4000 rpm, 4 °C (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg) von der Saline getrennt und bei -20 °C gelagert.

#### 2.4.1.2 Anzucht durch *batch*-Fermentation im Bioreaktor

Zur Anzucht von *E. coli* im Bioreaktor wurde ein 10 l Rührkessel mit einem 8 l Arbeitsvolumen (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen) zur *batch*-Fermentation verwendet. Die Temperaturregulation wurde durch einen Glasdoppelmantel realisiert. Die Zuluft wurde dem Bioreaktor durch einen 0,2 µm Sterilfilter (SpiralCap™, Pall Gelman Sciences, Rossdorf) zugeführt. Die Abluft wurde durch einen Kühler geleitet und mittels eines 1,0 µm Bacterial Airvent Filter (Pall Gelman Sciences, Rossdorf) sterilfiltriert.

Die Vorkulturen wurden in 500 ml Erlenmeyerkolben über Nacht angezogen (siehe 2.1.2). Hiermit wurden 8 l LB-Medium im Bioreaktor mit einer OD von 0,1 angeimpft. Während deren Kultivierung wurden die Temperatur, die Rührgeschwindigkeit, die Luftzufuhr, der pH-Wert und der Sauerstoffpartialdruck kontrolliert. Die Temperatur wurde auf 30 °C geregelt, der pH-Wert auf pH 7. Die eingestellte online-Regulation des pH-Wertes erfolgte mit Phosphorsäure und Natronlauge von außen. Der pO<sub>2</sub> wurde über die Rührerdrehzahl eingestellt. Dazu wurde bei halbmaximaler Drehzahl (600 rpm) der pO<sub>2</sub> mit sterilem Medium bei einer Luftzufuhr von 6 l/min auf 100 % geeicht. Während des Wachstums wurde der pO<sub>2</sub> auf mindestens 30 % gehalten. Die Datenverarbeitung

erfolgte mit Hilfe des Softwarepakets MFCS (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen), das ebenfalls für die Datenerfassung und Kontrolle aller Regelkreise genutzt wurde.

### **2.4.2 Aufschluß der Zellen**

Zur Isolation der Peptide wurden die Zellen in Puffer (20 mM NaP<sub>i</sub>, 500 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, pH 8) mit 20 µg/ml DNase und 1/2 Tablette Protease-Inhibitor-Cocktail (Complete®, EDTA-free) resuspendiert und mit einer French® Press (Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA) bei 1.100 psi in zwei Durchgängen aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (10.000 rpm, 4 °C, 10 min, Beckman Coulter Inc., Unterschleissheim-Lohhof, Rotor JA 25.50) vom Cytoplasma getrennt. Aus den Cytoplasmafraktionen wurden direkt die Extensionen isoliert.

### **2.4.3 Isolation der Extensionen**

Die Isolation der Extensionen erfolgte mit Hilfe eines selbst-schneidenden Anhangs (Intein) [Chong *et al.*, 1997; Chong *et al.*, 1998; Evans *et al.*, 1998] . Dazu lag das zu überexprimierende Gen am 5'-Ende der Gene für eine Chitin-Bindedomäne und ein Intein (VMA aus *Saccharomyces cerevisiae*) in dem Plasmid pTYB2 (IMPACT™ T7 System, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) fusioniert vor. Nach Überexpression in *E. coli* wurde ein Fusionsprotein erhalten. Mit Hilfe der C-terminalen Chitin-Bindedomäne konnte das Fusionsprotein an eine Chitin-Säule gebunden werden. Nach dem Waschen mit 18 Säulenvolumen durch Puffer (siehe 2.4.2) wurde das Intein mit 30 mM DTT aktiviert und das zu isolierende Peptid vom Intein und der Chitin-Bindedomäne durch Inkubation über Nacht bei 4 °C freigesetzt. Die Elution erfolgte mit 30 ml Puffer bei 4 °C in 15 Fraktionen. Die Säulenregenerierung erfolgte bei RT mit 1 % SDS, wobei die Zweifachfusion aus Intein und Chitinbindedomäne eluiert wurde. Anschließend wurden die Säulen zur erneuten Verwendung äquilibriert.

### **2.4.4 Reinigung der Peptide**

Die Reinigung und Überführung der Peptide in andere Puffer wurde entweder durch Gelfiltration oder mittels *Reversed Phase*-Chromatographie durchgeführt.

#### **2.4.4.1 Gelfiltration und Dialyse**

Die Gelfiltration wurde mit einer HIPrep® 26/10 Desalting-Säule (Säulenmaterial: Sephadex® G-25, Ausschlussvolumen: >5000 Da, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) mittels *Fast Pressure Liquid*-Chromatografie (FPLC) durchgeführt. Die Entsalzung wurde mit 20 mM Natriumphosphat, pH 6 durchgeführt. Der Durchfluss wurde auf 5 ml/min eingestellt. Aufgrund der Größe konnten nur Ionen und kleine



Moleküle in die Hohlräume eindringen, die Peptide blieben im Ausschlussvolumen und konnten mit einem UV-Detektor (Uvicord SII, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) in den Elutionsfraktionen festgestellt werden. Das ausgetauschte Salz wurde mit einem Leitfähigkeitsdetektor (Conductivity Monitor, Amersham Pharmacia Biotech AB) gemessen.

Die Peptidfraktionen wurden anschließend vereinigt und in einer „Amicon-Zelle“ (Millipore, Bedford, MA, USA) mit einer DIAFLO®-Membran YM-1 konzentriert.

#### **2.4.4.2 Reversed Phase-Chromatografie**

Zur Entsalzung und Trocknung der Peptide wurde eine Sek-Pak®-PlusC18-Cartidge-Säule (Waters, Milford, Massachusetts, USA) mit 5 ml Methanol aktiviert. Vor der Probenauftragung wurde die Säule mit 10 ml *aqua dest.* gespült. Nach Auftrag der Proben wurde die Säule mit 20 ml *aqua dest.* gewaschen. Die Elution erfolgte in drei Schritten mit je 1,5 ml: zuerst wurde Methanol:Wasser (70:30; v/v), dann Methanol:Wasser (80:20; v/v) und schließlich ein Gemisch aus Methanol:Wasser:1 N Essigsäure (80:15:5; v/v/v) verwendet. Im letzten Elutionsgemisch befanden sich jeweils die Peptidfraktionen. Anschließend wurden die Peptidfraktionen im Vakuum getrocknet.

#### **2.4.5 Proteinbestimmung**

Die Quantifizierung der isolierten Peptidfraktionen wurde nach Bradford (1976) durchgeführt. Hierzu wurde das Fertigreagenz Roti®-Nanoquant (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) verwendet.

#### **2.4.6 SDS-PAGE**

Zur qualitativen Bewertung der Peptidisolation wurde eine 12,5 %ige SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt [Lämmli, 1970]. Die Färbung erfolgte mit Coomassie-Brilliant-Blue [Sambrook *et al.*, 1989].

### **2.5 Spektroskopische Methoden**

#### **2.5.1 CD-Spektroskopie**

##### **2.5.1.1 Grundlagen**

Die Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie eignet sich zur Bestimmung von Sekundärstrukturgehalten bei Proteinen. Proteine zeigen aufgrund unterschiedlicher Wechselwirkungen mit links- und rechts-zirkularpolarisiertem Licht ein CD-Signal [Schnatzke, 1981]. Die Untersuchung erfolgt im fernen UV, z. B. bei 250 - 180 nm. Das Chromophor der Proteine, das in diesem Bereich absorbiert, ist die Amid-Gruppe der

Peptid-Bindung. Die Amid-Gruppe hat hier zwei Übergänge:  $n \rightarrow \pi^*$  ( $\epsilon \approx 20/M \times \text{cm}$  und  $\lambda_{\text{max}} \approx 220 \text{ nm}$ ) und  $\pi \rightarrow \pi^*$  ( $\epsilon \approx 7000/M \times \text{cm}$  und  $\lambda_{\text{max}} \approx 195 \text{ nm}$ ). Die Amidgruppe ist ein inhärent achirales Chromophor. Die für die CD-Aktivität notwendige Chiralität wird durch das benachbarte chirale Zentrum am  $C_\alpha$ -Atom induziert. Es hat sich gezeigt, daß unterschiedliche Sekundärstrukturen unterschiedliche UV-CD-Spektren liefern. Die Aufspaltung der einzelnen Übergänge in mehrere Banden ist auf das sogenannte *exciton-splitting* zurückzuführen.

Bei der Messung wird mit einer Frequenz im kHz-Bereich abwechselnd links und rechts zirkularpolarisiertes Licht erzeugt. Gemessen werden dann die unterschiedlichen Extinktionen ( $\epsilon$ ). Der Unterschied (Anisotropiefaktor,  $g$ ; 2.1) ist bei Proteinen relativ gering. Wegen des zusätzlich geringen Signal-Rausch-Verhältnisses gerade bei kurzen Wellenlängen müssen Spektren akkumuliert werden.

$$\text{Anisotropiefaktor } g = \frac{\epsilon_{\text{rechts}} - \epsilon_{\text{links}}}{\epsilon_{\text{unpolarisiert}}} = \frac{\Delta\epsilon}{\epsilon} \approx 10^{-4} \quad (2.1)$$

Die bestimmten Unterschiede der molaren Extinktionskoeffizienten werden aus historischen Gründen mit Gleichung 2.2 in die spezifischen Elliptizitäten  $[\Theta]$  umgerechnet.

$$[\Theta] = \frac{100 \times \Theta}{\lambda \times c} = 3298 \times \Delta\epsilon \quad \text{Einheit von } [\Theta]: \frac{\text{deg} \times \text{cm}^2}{\text{dmol}_{\text{aa}}} \quad (2.2)$$

$\Theta$  konzentrationsabhängige Elliptizität,  $\lambda$  Wellenlänge,  $c$  Proteinkonzentration

Neben der Bestimmung der Sekundärstrukturgehalte können CD-spektroskopische Untersuchungen auch dazu verwendet werden, Denaturierungen von Proteinen durch Temperatur, pH-Verschiebungen oder andere Substanzen (wie z. B. Harnstoff) zu detektieren. Zur Bestimmung des Schmelzpunktes werden bei  $\alpha/\beta$ -Proteinen in einem flachen Temperaturgradienten die CD-Signale bei 222 nm gemessen [Beck *et al.*, 1997]. Die Existenz eines *isodichoren* Punktes zeigt außerdem, daß es sich bei einem solchen Übergang um einen direkten Übergang zwischen zwei Zuständen handelt.

### 2.5.1.2 Auswertung

Zur Bestimmung von Sekundärstrukturgehalten aus CD-Spektren stehen eine Anzahl unterschiedlicher Programme zur Verfügung [Greenfield, 1996]. Entscheidend für alle moderneren Auswertungsprogramme ist die Eingabe von spezifischen Elliptizitäten, weshalb eine sehr genaue Proteinkonzentration angegeben werden muss ( $\pm 10 \%$ ).

Bei allen Programmen wird mit einem Basisdatensatz dem gemessenen Spektrum ein theoretisches Spektrum angeglichen. Als Basisdatensatz dienten zunächst Peptide mit einer Sekundärstruktur, später dann CD-Spektren von Proteinen mit bekannter Kristallstruktur. Bei den heute üblichen Verfahren wird vereinfachend davon ausgegangen, daß sich die CD-Signale der einzelnen Sekundärstrukturelemente linear addieren. Eine große Beschränkung ist darin zu sehen, daß die einzelnen Sekundärstrukturelemente je nach Größe und Konformation unterschiedliche CD-Spektren liefern und daß die Wechselwirkungen der einzelnen Sekundärstrukturen untereinander sowie die Beiträge der aromatischen Aminosäuren unberücksichtigt bleiben. Dies führt dazu, daß man mit Fehlern von 10 Prozentpunkten und mehr bei  $\alpha$ -Helices und anderen Sekundärstrukturen rechnen muss.

Im folgenden werden die grundlegenden Verfahrensweisen der in dieser Arbeit verwendeten Auswertungsprogramme beschrieben:

Das Programm **Contin** von Provencher und Glöckner (1981) hat als Basisdatensatz 17 Proteine mit bekannter Struktur. Um das Problem der Abhängigkeit der Lösung vom verwendeten Datensatz zu verringern, wird eine Ridge-Regression verwendet. Dabei wird den Spektren, die dem gemessenen am ähnlichsten sind, durch einen Regulatorterm ein höheres Gewicht zugeteilt als den unähnlicheren. Contin kann im Vergleich zu den anderen Programmen insbesondere  $\beta$ -turns vorhersagen.

Das Programm **Selcon** von Sreerama und Woody (1993) verwendet eine erste Einschätzung der Sekundärstrukturgehalte als Grundlage für weitere Rechenzyklen bis zur Konvergenz der Lösung. Dabei werden die Basisdatensätze mit Hilfe der SVD (*single value decomposition*) dekonvolviert. Bei dem Programm stehen verschiedene Varianten zur Verfügung, die unterschiedliche Vergleichsspektren und unterschiedliche Methoden zur Bestimmung des Sekundärstrukturgehaltes bei Röntgenstrukturen beinhalten. Allgemein sind die vorhergesagten Messwerte bei  $\alpha$ -Helices etwas zu hoch, bei  $\beta$ -Faltblättern etwas zu gering.

Das Programm **K2D** von Andrade *et al.* (1993) verwendet ein neuronales Netzwerk, bei dem das gewinnende Neuron die Lösung enthält. Obwohl dieses Programm lediglich Werte bis 200 nm verwendet, erhält man recht gute Einschätzungen für  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt.

Für die Messungen wurden Proteinkonzentrationen von ca. 0,2 mg/ml meist in 10 mM NaP<sub>i</sub>-Puffer, pH 6, verwendet. Die Messungen fanden bei folgenden Standardbedingungen statt:

Wellenlängenbereich: 185 - 250 nm

Auflösung:	0,1 nm
Geschwindigkeit:	50 nm/min
Akkumulationen:	10
Bandweite:	1 nm
Temperatur:	20 °C
Stickstofffluss:	5 l/min

Zur Auswertung der Spektren wurden die Programme Contin, K2D und Selcon verwendet.

Für die Schmelzkurven wurden mit folgenden Einstellungen flache Temperaturgradienten gefahren:

Wellenlänge:	222 nm
Auflösung:	0,1 nm
Temperaturgradient:	20 °C/h
Stickstofffluss:	5 l/min

### 2.5.2 NMR-Spektroskopie

Die Kernmagnetresonanz-Spektroskopie (NMR) hat sich seit der Einführung von 2D NMR-Experimenten und Doppelresonanz-Untersuchungen zur Ermittlung größerer biologischer Moleküle etabliert. Nach der Einführung der NMR-Technik durch Bloch und Hansen (1946) wurde das erste Protein erst 1982 durch Wagner und Wüthrich mittels NMR-Spektroskopie strukturell aufgeklärt, allerdings waren schon 1997 924 NMR-Strukturen in der Brookhaven Protein Data Bank erfasst [Wagner, 1997].

Die NMR-Spektroskopie beruht auf der Anregung magnetisch aktiver Atomkerne mittels Radiowellen. Dazu zählen alle Kerne mit ungeradem Spin ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ). Durch die spezifische Absorption kann jeder Kern selbst und dessen Umgebung definiert werden. Weil allerdings in Proteinen viele Atome die gleiche Umgebung und gleiche oder ähnliche Bindungspartner aufweisen, sind sehr leistungsfähige Magnetfelder erforderlich, die die einzelnen Resonanzen voneinander trennen. Durch Einstrahlung von Störsignalen ist es möglich die nächsten Raumpartner eines angeregten Atomes zu identifizieren (*nuclear-overhauser enhancement*, NOE). Zweidimensionale Auftragung und Dotierung der Proteine mit magnetisch aktiven Kernen führt zu weiterer Verbesserung der Signalzuordnung [Bax, 1989]. Durch Kombination verschiedener Techniken ist es zur Zeit möglich, Proteine mit maximal 64 kDa strukturell aufzuklären. Im Gegensatz zur Röntgenkristallstruktur können mittels NMR-Spektroskopie dynamische Effekte in Proteinen in ihrer natürlichen Umgebung (wässriges Milieu) untersucht werden.

Alle NMR-Untersuchungen wurden am Biozentrum in Basel in der Abteilung Grzesiek an einem 600 MHz-Spektrometer der Firma Bruker-Physik AG, Karlsruhe, durchgeführt. Die jeweiligen Lösungsmittelbedingungen sowie die Gerätefeldstärke sind in Klammern vermerkt. Die chemischen Verschiebungen sind in dimensionslosen  $\delta$ -Werten (ppm) angegeben und auf Tetramethylsilan ( $\delta = 0$  ppm) als internen Standard bezogen. Die Anzahl der durch Integration ermittelten Protonen wurde in Klammern aufgeführt. Die Kopplungskonstanten (J) wurden in Hertz (Hz) angegeben. Für jede Messung wurden 1-2 mM Protein in einer möglichst salzfreien D<sub>2</sub>O-Lösung verwendet.

### 2.5.3 FT-IR-Spektroskopie

Die Infrarot-(IR)-Spektroskopie ist eine Standard-Spektroskopie zur Bestimmung kleiner Moleküle durch Anregung der Molekülbindungen. Zur schnellen Spektrenaufnahme wird meist ein Michelson-Interferometer verwendet, wobei ein zeitabhängiges Spektrum entsteht. Durch Fourier-Transformation (FT) wird dieses zeitabhängige Spektrum in ein frequenzabhängiges Spektrum überführt. Die einzelnen Absorptionsbanden in Wellenzahlen aufgetragen können jeder einzelnen Bindung zugeordnet werden.

Zur Sekundärstrukturbestimmung von Proteinen sind die Schwingungsbanden der Amidbindung von großem Interesse. Hierbei liegt die Anregungswellenzahl der Carbonyl-Valenzschwingung der Amidbindung (Amid-I) im Bereich von 1700-1600 cm<sup>-1</sup> [Goormaghtigh *et al.*, 1994a/b]. Eine  $\alpha$ -Helix zeigt eine Amid-I-Bande bei 1650 cm<sup>-1</sup>. Ein  $\beta$ -Faltblatt ist durch die Amid-I-Bande um 1630 cm<sup>-1</sup> zu erkennen. Die genaue Sekundärstrukturbestimmung erschwert sich dadurch, dass sehr viele Amidschwingungen überlagert sind und dadurch eine Bandenverbreiterung zu beobachten ist. Die Amid-I-Bande muss somit auf mehrere Lorentz- oder Gauß-Funktionen aufgeteilt werden und die Lage und Fläche jeder einzelnen Funktion bestimmt werden [Byler und Susi, 1986]. Die Auswertung dieser Flächen ergibt eine prozentuale Verteilung von Sekundärstrukturen in einem Protein oder Peptid. Der Fehler liegt mit 10 % im Bereich der Sekundärstrukturbestimmung mit Hilfe der CD-Spektroskopie.

Die Messungen wurden mit dem Bruker IFS 66V (Bruker Analytische Messtechnik, Karlsruhe, Germany) in der Abteilung Büldt in Zusammenarbeit mit Herr Heberle (Forschungszentrum Jülich) durchgeführt. Für die Untersuchung wurden 1-2 mM Protein in D<sub>2</sub>O gelöst. Das ganze Spektrometer wurde auf 4 mbar evakuiert und die Probenkammer mit trockener Luft gespült. Zur Erzeugung der infraroten Wellenlänge wurde ein Globar verwendet und ein MCT (*mercury cadmium telluride*)-Detektor zur Detektion der Strahlung. Im nahen Infrarot wurde auf eine Wolfram-Halogenlampe umgeschaltet und mit einer Siliciumdiode die Strahlung detektiert.

### 2.5.4 Resonant Mirror-Spektroskopie

Mit Hilfe der *Resonant Mirror*-Spektroskopie ist es möglich, Interaktionen zweier Bindungspartner in Echtzeit zu detektieren und zu quantifizieren [Cush *et al.*, 1993]. Hierbei macht man sich zu nutze, dass linear polarisiertes, monochromatisches Licht beim Durchtritt durch zwei Medien unterschiedlich gebrochen wird. Ab einem bestimmten Einstrahlwinkel (kritischer Winkel) erfolgt bei dem Durchtritt vom dichteren Medium zu einem weniger dichten Medium Totalreflexion. Durch ein Oberflächenmaterial mit einer dichten Titan oder Hafniumschicht, die oben und unten von einer gering brechenden Silikatschicht umgeben ist, kann man eingestrahktes Laserlicht in der Titan- bzw. Hafniumschicht durch Totalreflexion „fangen“. Bei genauer Einstellung des Einstrahlwinkels zwischen dem kritischen Winkel und  $90^\circ$  ergibt sich ein Winkel, bei dem sich ein maximales elektrisches Feld am Rand der Metallschicht ausbildet und mit der geringer brechenden Schicht interferiert. Hierbei wird Energie absorbiert und ein geringerer Teil totalreflektiert (frustrierte totale innere Reflexion). Der Winkel ist abhängig von der Massenänderung der äußeren Oberfläche. Innerhalb dieses totalen inneren Reflexions (TIR)-Bereiches gibt es einen kleinen Winkelbereich, bei dem eine maximale Absorption der eingestrahkten Energie mit der Materie beobachtet wird. Dabei entsteht ein evaneszierendes Feld. Bei Änderung der Masse an der untersuchten Oberfläche ändert sich die Winkeleinstellung in Abhängigkeit von der Massenzunahme. Somit ist eine Interaktion (Massenzunahme) durch Winkeländerung des evaneszierenden Feldes detektierbar.

Alle Messungen wurden mit einem IAsys Biosensor Plus (Thermo Labsystems GmbH, Frankfurt/M.) durchgeführt. Dazu wurden Küvetten mit zwei Zellen verwendet, die mit je 50  $\mu\text{l}$  Puffer oder Bindungspartner versehen wurden. Die Anbindungsquantifizierung erfolgte mit zugegebenem Bindungspartner im Konzentrationsbereich von 10 nM bis 10  $\mu\text{M}$ .

#### 2.5.4.1 Herstellung geeigneter Oberflächen

Zur Zeit sind fünf Küvetten mit unterschiedlichen Anbindungsoberflächen durch die Herstellerfirma (Labsystems GmbH, Frankfurt/M.) zu beziehen. In Abhängigkeit zum Versuchsaufbau wurde die entsprechende Küvette gewählt, an die ein Bindungspartner in richtiger Orientierung und Form angebunden werden konnte.

### **Kovalente Anbindung von Peptiden an aktivierte Dextranoberflächen**

Peptid-Peptid-Wechselwirkungen wurden untersucht, indem ein Interaktionspartner kovalent an eine beschichtete Membran angebunden wurde. Dazu standen folgende Oberflächen zur Verfügung: Biotin-, Carboxymethyldextran (CM)-, Carboxylat (C)-, Aminosilan (AS)-Oberflächen. Die Anbindung eines Bindungspartners (Peptid) erfolgte N-terminal an die CM- und C-Oberflächen nach Standardprotokollen mit Hilfe von N-Hydroxysuccinimid (NHS) und Ethylendiamincarbodiimid (EDC) 1.1/1.3 (Labsystems GmbH, Frankfurt/M.). C-terminal wurde die Anbindung mit Glutaraldehyd durchgeführt (Protokoll 1.2). Die Anbindung an Biotin-Oberflächen erfolgte über Avidin nach Angaben des Protokolls 1.4. Dazu wurde das anzubindende Peptid zunächst biotinyliert [Della-Penna *et al.*, 1986].

### **Lipidbelegung nicht-derivatisierter Oberflächen**

Für die Nicht-derivatisierten Oberflächen wurden vorher jeweils unterschiedliche Lipide in 1,25 %igem n-Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid (PBS/OG) gelöst und in einer Konzentration von 2 mg/ml (PBS/OG) aufgegeben. Die Belegung erfolgte nach Angaben des Herstellers (Protokoll 1.6). Dabei wurde die Oberfläche zuerst mit PBS gewaschen und der Resonanzscan auf null geeicht. Anschließend wurden die beiden Zellen in der Küvette mit 50  $\mu$ l PBS/OG versehen und nach Absaugen 30  $\mu$ l Lipidlösung zugegeben. Nach Erreichen eines Plateauwertes im Spektrum wurde das OG durch Zugabe von PBS ausverdünt, so daß die Lipide sich aus der wässrigen Phase abtrennen konnten. Dies konnte im Spektrum durch Erreichen eines Plateauwertes beobachtet werden. Nach der dritten Zugabe von PBS war meist der höchste dauerhafte *response* erreicht. Die Inkubation der Zellen in PBS nach einigen Waschschritten erlaubte die Quantifizierung der Anbindung durch Abzug der Grundlinie vor Anbindung. Grundlinienerhöhungen um 500 arcs lassen eine Monolage vermuten, Grundlinienerhöhungen um 1000 arcs eine Doppellage. Die Homogenität der erzeugten Lage konnte mit Hilfe des Resonanzscan beobachtet werden. Bei Vorliegen einer Inhomogenität wurde abwechselnd mit 10 mM NaOH und 10 mM HCl gespült, bis der Resonanzscan nur noch ein Maximum zeigte.

#### **2.5.4.2 Quantifizierung von Peptid/Peptid- und Peptid/Lipid-Interaktionen**

Die Quantifizierung der Peptid/Peptid- und Peptid/Lipid-Wechselwirkungen erfolgte, indem entweder die Referenzzelle zeitgleich mit demselben Puffer versehen wurde, wie die Messzelle, nur ohne Interaktionspartner. Die Referenzzellendaten wurden anschließend von dem Anbindungsereignis der Messzelle abgezogen. Oder die Messzelle wurde vor der

Anbindungsuntersuchung auf den Anbindungspuffer kalibriert, so dass die Basislinie sich konstant verhielt ( $d(\text{arcs})/dt < 5 \text{ min}^{-1}$ ). Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FASTfit (Labsystems GmbH, Frankfurt/M.). Die Ordnung der Anbindung wurde entsprechend dem besten Ergebnis der Quantifizierung gewählt. Die Berechnung der Anbindungsmasse entsprach für AS- und C-Oberflächen  $1 \text{ ng/mm}^2 = 600 \text{ arcs}$ . Für die CM-Oberfläche, die den angebondenen Bindungspartner weiter von der Metalloberfläche entfernt anbietet, wurde  $1 \text{ ng/mm}^2 = 200 \text{ arcs}$  angegeben.

### 2.5.5 Dynamische Lichtstreuung

Teilchen, die mit einer planaren Lichtwelle beleuchtet werden, reflektieren Teile des Lichtes in alle Raumrichtungen. Kleine Moleküle streuen in alle Raumrichtungen gleichzeitig, wohingegen Teilchen mit der Größe des einfallenden Lichtes bevorzugt in bestimmte Richtungen streuen. In Abhängigkeit der verwendeten Wellenlänge des Lasers und der Größe der Teilchen zeigt das gestreute Licht dabei ein charakteristisches Intensitätsmuster. Dieses Muster resultiert aus Interferenzen zwischen dem gestreuten Licht der Teilchen und führt zu einer Sammlung von hellen (konstruktive Interferenz) und dunklen (destruktive Interferenz) Punkten im Streumuster. Bei Lichtstremessungen wird zwischen der statischen (SLS) und der dynamischen Lichtstreuung (DLS) unterschieden.

Bei der statischen Lichtstreuung wird die Intensität des gestreuten Lichtes, das senkrecht zu der Ebene der auftretenden Polarisation liegt, für ein kleines, gelöstes Molekül mit geringer Konzentration bei einem gegebenen Winkel  $\Theta$  nach Gleichung 2.3 berechnet:

$$R(\Theta) = M_w \times P(\Theta) \times K^* \times c \quad (2.3)$$

$R(\Theta)$	Rayleigh-Verhältnis (absolute Intensität des gestreuten Lichtes bei Winkel $\Theta$ )
$M_w$	Molekulargewicht des gestreuten Moleküls
$P(\Theta)$	Formfaktor (Verhältnis des gestreuten Lichts bei $\Theta$ im Vergleich zu $\Theta = 0$ )
$K^*$	optische Konstante, $K^* = 4\pi^2 n_s^2 (dn/dc)^2 / (\lambda^4 N_A)$

Bei einer bekannten Konzentration  $c$  und einem bekannten spezifischen Brechungsindex  $dn/dc$  kann mit dem zu einem Zeitpunkt gemessenen Wert von  $R(\Theta)$  das durchschnittliche Molekulargewicht berechnet werden.

Bei der dynamischen Lichtstreuung wird anstatt eines gemittelten Wertes für die gestreute Intensität zu einem einzigen Zeitpunkt, die Fluktuation der Intensität des gestreuten Lichtes in Abhängigkeit der Zeit gemessen. Aus dieser zeitlichen Veränderung der Intensitätsfluktuation kann für einzelne Teilchen wie z. B. Proteine, DNA, Polysaccharide



oder Mizellen ein translationaler Diffusionskoeffizient berechnet werden, aus dem sich der hydrodynamische Radius und das Molekulargewicht sowie Informationen über die Konformation, Interaktionen oder das Aggregationsverhalten ableiten lassen. Das beobachtete Streumuster verändert sich mit der Zeit, da sich die Position der einzelnen Teilchen gemäß der Brown'schen Molekularbewegung verändert. Diese Fluktuationen sind sehr groß bei kleinen Molekülen und weniger stark bei größeren Teilchen. Die Intensität  $I(t)$  des gestreuten Lichtes wird nun für die Berechnung der zeitabhängigen Intensitäts-Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  verwendet, die ein Integral darstellt. Es gilt Gleichung 2.4:

$$G(\tau) = \int I(t)I(t+\tau)dt / N \quad (2.4)$$

Die Funktion  $G(\tau)$  wird durch eine Konstante  $N$  normalisiert, welche sich aus der erwarteten Photonen-Hintergrundrate ergibt. Das Integral wird nun durch die Summe über die Messdauer angenähert. Die erhaltene Korrelation kann dabei nur zu diskreten Zeitpunkten  $\tau$  erhalten werden, da sie häufig im exponentiellen Zusammenhang mit der im Signal erhaltenen Information steht (2.5).

$$G(\tau) = b + \sum c_i \times \exp(-\tau / \tau_i) \quad (2.5)$$

Dabei treten drei *fitting*-Parameter auf: die *baseline*  $b$ , die Amplitude  $c_i$  und die verstrichene Zeit  $T_i$ . Dabei stellt  $b$  den *baseline*-Parameter dar, der sich von der Vollständigkeit der Autokorrelationsfunktion ableitet und idealerweise den Wert 1 betragen soll,  $c_i$ , die Amplitude, welche die Intensität des gestreuten Lichtes mit der Intensität des Hintergrundes vergleicht und  $T_i$ , die verstrichene Zeit, die ein Teilchen benötigt, um die Entfernung  $1/q$  zurückzulegen. Die Summe erstreckt sich von  $j = 1$  bis  $k$ , wobei  $k = 1$  ist für eine monomodale Regression (nur eine Teilchengröße) und  $k = 2$  für eine bimodale Regression (zwei Teilchengrößen).

Die verstrichene Zeit  $T_i$  hängt nun von dem Quadrat des Wellenvektors  $q$  und dem translationalen Diffusionskoeffizienten  $D_T$  ab. Daraus ergibt sich Gleichung 2.6:

$$G(\tau) = 1 + \exp(-2 \times D_T \times q^2 \times \tau) \quad \text{mit} \quad q = \frac{[4\pi n_s \sin(\theta/2)]}{\lambda} \quad (2.6)$$

Aus der Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  kann nun der Diffusionskoeffizient  $D_T$  errechnet werden, der über die Stokes-Einstein-Beziehung mit dem hydrodynamischen Radius  $R_H$  in Beziehung steht (2.7).

$$\text{Stokes-Einstein-Beziehung} \quad D_T = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (2.7)$$

Nun kann der hydrodynamische Radius  $R_H$  und die Größenverteilung verschiedener Teilchen innerhalb der Probe berechnet werden. Dabei werden Teilchen, die sich in weniger als zwei hydrodynamischen Radien unterscheiden nicht mehr aufgetrennt und erscheinen als ein einziger *peak*, der zwischen den beiden theoretischen liegt.

Bei der DLS ist im Gegensatz zur SLS keine zusätzliche Kenntnis des Differential  $dn/dc$  des spezifischen Brechungsindex und der Teilchenkonzentration notwendig, um den hydrodynamischen Radius des Moleküls zu bestimmen. Ausgehend vom berechneten hydrodynamischen Radius  $R_H$  kann nun das Molekulargewicht  $M_W$  auf zwei Wegen berechnet werden.

### 1. Globulärer Standard-Auswertungsmodus

Aus einer Vielzahl gut charakterisierter globulärer Proteine wurde ein empirischer Zusammenhang zwischen dem hydrodynamischen Radius und dem Molekulargewicht abgeleitet. Es gilt Gleichung 2.8:

$$M_W = (1,549 \times R_H)^{2,426} \quad (2.8)$$

### 2. *volume-shape-hydration*-Auswertungsmodus

Bei der Berechnung des Molekulargewichtes wird davon ausgegangen, dass das Protein nicht kugelförmig ist. Es werden dabei neben dem hydrodynamischen Radius  $R_H$  das partielle spezifische Volumen  $V_S$  und das Reibungsverhältnis  $f$  (*shape-hydration-factor*), das eine Information über die Molekülform enthält, miteinbezogen. Die jeweiligen Werte für  $R_H$  und  $V_S$  wurden experimentell bestimmt. Für die Berechnung des  $M_W$  gilt Gleichung 2.9:

$$M_W = \frac{4 / 3 \pi N_A (R_H / f)^3}{V_S} \quad (2.9)$$

Die Untersuchungen wurden an dem Gerät DynaPro 801 (Protein Solutions Inc., Charlottesville, VA, USA) durchgeführt.

## 2.6 Physiologische Untersuchungen unter Osmostress

Die physiologischen Untersuchungen der Glycinbetainaufnahme, der Veränderung des Zellvolumens und des Stoffwechselprodukte unter Osmostress wurde am Wildtyp-Stamm ATCC 13032 durchgeführt.

### 2.6.1 Anzucht der Zellen

Die Zellen wurden über Nacht in Vollmedium angezogen und bei einer OD von zwei in CGXII- oder MMI-Medium angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und 110 rpm.

Bei einer erreichten OD von mindestens 6 wurden die Zellen mit 750 mM NaCl hyperosmotisch geschockt und der weitere Wachstumsverlauf sowie intrazelluläre Verbindungen untersucht.

### **2.6.2 Aufschluß der Zellen**

Zum Aufschluß der Zellen wurden 1 ml Kultur entnommen und die Zellen durch einen Filter auf einer Absauganlage vom Medium befreit. Anschließend wurde mit 1 ml isoosmolarem Medium gewaschen. Mit 1 ml 0,1 %igem CTAB wurden die Zellen 1 min inkubiert, wobei die Membranen zerstört wurden. Nach Entnahme des Filters aus der Lösung wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (1 min, 15000 rpm, 4 °C) entfernt. Die intrazellulären Substanzen im Überstand konnten dann bei -20 °C gelagert werden.

### **2.6.3 Bestimmung des internen Kaliumgehaltes**

Die Kaliumbestimmung wurde flammenphotometrisch (ELEX 6361, Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Als Brenngas wurde ein Luft/Propan-Gemisch verwendet. Hierzu wurde eine Eichgerade mit 0 bis 100 µM KCl hergestellt und die intrazellulären Kaliumbestimmungen anhand dieser bestimmt.

### **2.6.4 Bestimmung interner Aminosäuren**

Die internen Aminosäuren wurden mit einer *Reversed Phase* HPLC quantifiziert. Hierzu wurde ein HPLC-Gerät vom Typ HP 1090 M (Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn) mit angeschlossenem Fluoreszenzdetektor (HP 1046 A) verwendet. Die Steuerung der Anlage und die Auswertung der Daten erfolgte computergestützt über eine „HP-Chemstation“ (Hewlett Packard). Zur Auftrennung der Substanzen wurde eine Vorsäule (40×4 mm Hypersil ODS 5) mit einer Hauptsäule (Hypersil ODS 5, CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) kombiniert. Zur Vorsäulenderivatisierung wurden 1 µl der zu analysierenden Aminosäure-Lösung automatisch mit 4 µl OPA/2-Mercaptopropionsäure-Fertigreagenz (Pierce Europe BV, Niederlande) und anschließend mit 1 µl FMOC-Cl gemischt [Schuster, 1988]. Als mobile Phase wurde eine Mischung von 30 mM Natriumacetat und 0,5 %iges THF, pH 7,2 (Puffer A) und Acetonitril/Methanol/100 mM Natriumacetat (2:2:1; v/v/v) (Puffer B) gewählt. Bei 40 °C wurde mit dem in **Tab. 2.7** dargestellten Trennprogramm gearbeitet. Die Fluoreszenzdetektion der Aminosäurederivate erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 230 (266) nm und einer Emissionswellenlänge von 455 (310) nm. Die Aminosäurekonzentrationen wurden über einen Vergleich mit einem externen Standard berechnet.

**Tab. 2.7** Trennprogramm zur Aminosäureaufreinigung mit der HPLC

Zeit [min]	Puffer B [%]	Flußrate [ml/min]	Anregungswellenlänge [nm]
0	7	0,8	230
3	10	0,8	230
12	15	0,8	230
12,1	15	1,0	230
20	50	1,0	230
22-25	100	1,0	266

### 2.6.5 Volumenbestimmung von *C. glutamicum*-Zellen

Die Zellvolumenbestimmung wurde mit *C. glutamicum* in Minimalmedium durchgeführt. Dazu wurden 1 ml Kultur 1 min mit  $^3\text{H}_2\text{O}$  [0,45  $\mu\text{Ci/ml}$ ] und 20 mmol/l [ $^{14}\text{C}$ ]-Taurin [0,12  $\mu\text{Ci/ml}$ ] unter Rühren bei 30 °C inkubiert. Taurin ist nicht permeabel,  $^3\text{H}_2\text{O}$  verteilt sich allerdings gleichmäßig im intra- und extrazellulären Raum [Stock *et al.*, 1977; Rottenberg, 1979]. Anschließend wurden die Ansätze bei 14.000 rpm 5 min zentrifugiert (Zentrifuge Z 200 M/H, Hermle Labortechnik, Wehingen) und der Überstand von den Zellen getrennt. Nach Aufschluß der Zellen mit 500  $\mu\text{l}$  0,1 %igem CTAB (w/v) durch 1 minütiges Inkubieren wurde das Cytoplasma durch erneute Zentrifugation von den Zelltrümmern getrennt. Von der Cytoplasmafraktion wurden 400  $\mu\text{l}$  und von dem Überstand 200  $\mu\text{l}$  mit Szintillationsflüssigkeit (Rotiscint®) gemischt und die Zerfälle pro Minute mit dem Scintillationszähler LS 6500 (Beckman Coulter, Fullerton, USA). Das Zellplasmavolumen wurde nach Gleichung 2.10 berechnet [Rottenberg, 1979, Rönsch, 2000]:

$$V_Z = \frac{P \times \left( \frac{A[^3\text{H}]_{\text{Zellen}}}{A[^3\text{H}]_{\text{Überstand}}} - \frac{A[^{14}\text{C}]_{\text{Zellen}}}{A[^{14}\text{C}]_{\text{Überstand}}} \right)}{\text{BTM}} \quad (2.10)$$

$V_Z$       Spezifisches Zellvolumen [ $\mu\text{l}/\text{mg}$  BTM]

A         radioaktive Aktivität [dpm]

P         Probenvolumen [ $\mu\text{l}$ ]

### **2.6.6 Untersuchung der Glycinbetain-Aufnahme in *C. glutamicum*-Zellen**

Die Zellen wurden in Minimalmedium angezogen und bei einer OD von 6 bis 8 zur Aufnahmemessung verwendet. Eine Probe wurde mit dem gleichen Medium auf eine OD von 1-2 verdünnt und davon 2 ml in einem Meßansatz bei 30 °C unter Rühren inkubiert. Die Aufnahme wurde wie unter der allgemeinen Bestimmung der Transportraten beschrieben (siehe 2.7.4) durchgeführt. Zur Unterdrückung der Glycinbetain-Aufnahme durch die anderen Glycinbetain-Aufnahmesysteme im Wildtyp (EctP und LcoP) wurde der 100fache Überschuss an unmarkiertem Ectoin gegenüber Glycinbetain zugegeben.

## **2.7 Untersuchungen von BetP unter Osmostress**

### **2.7.1 Präparation von Liposomen**

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

### **2.7.2 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 dreizehnmal extrudiert (Porengröße 400 nm). Die extrudierten Liposomen wurden für 10 min unter leichtem Schütteln bei RT mit 0,5 %igem Triton X-100 (v/v; entspricht 1  $\mu$ l/mg Lipid) behandelt. Gereinigtes Strep-BetP wurde mit den solubilisierten Liposomen gemischt, wobei das Lipid-Proteinverhältnis zwischen 10:1 und 30:1 (w/w) variiert wurde. Zur Abreicherung des Detergenz wurde direkt anschließend der Ansatz mit x mg Biobeads Nassgewicht (BioRad, München;  $x = \mu$ l Triton X-100  $\times \mu$ g Dodecylmaltosid  $\times 10$ ) zweimal für je 1 h bei RT und einmal mit der doppelten Menge Biobeads über Nacht bei 4 °C inkubiert, wodurch der Einbau des Proteins in die Liposomen gewährleistet wurde. Nach

Abtrennung der Biobeads wurden die Proteoliposomen zentrifugiert (400.000 g, 20 min, 15 °C), zweimal mit 100 mM  $\text{KPi}$  (pH 7,5) gewaschen, im gleichen Puffer resuspendiert (circa 400  $\mu\text{l}/\text{mg}$  Protein), aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### 2.7.3 Synthese von $^{14}\text{C}$ -Glycinbetain

Die Glycinbetain-Synthese erfolgte nach einer modifizierten Methode von Landfald und Strøm (1986) durch Oxidation von radioaktiv markiertem Cholin. Die Oxidation erfolgte enzymatisch durch das Enzym Cholin-Oxidase aus *Alcaligenes spec.* Hierbei wurden 250  $\mu\text{l}$  [Methyl- $^{14}\text{C}$ ]-Cholin Lösung, 1,85 MBq, und 250  $\mu\text{l}$  100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8, in dem 30 Units Cholinoxidase aus *Alcaligenes spec.* (Sigma, Steinheim) gelöst waren, in einem Reaktionsansatz vereinigt. Die Umsetzung von [Methyl- $^{14}\text{C}$ ]-Cholin zu [Methyl- $^{14}\text{C}$ ]-Glycinbetain erfolgte in einem Volumen von 500  $\mu\text{l}$  über Nacht bei 37 °C. Die Reinigung des synthetisierten Glycinbetains erfolgte mittels einer Kationenaustauscher-Säule (DOWEX 50 W x 8, Ø 0,5 cm, Höhe 2 cm). Durch Waschen mit 1 M HCl wurde das Säulenmaterial in die  $\text{H}^+$ -Form überführt und die Produktlösung aufgegeben. Das Glycinbetain wurde mit 2 ml 2 M Ammoniaklösung eluiert. Das Eluat wurde in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 500  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen. Die Reinigung des [Methyl- $^{14}\text{C}$ ]-Glycinbetains wurde nach der Methode von Blunden *et al.* (1981) mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert. Nach einer Laufzeit von etwa 6 h (Laufmittel Methanol:Wasser (50:50; v/v), Kieselgel TLC-Platten, Merck KGaA, Darmstadt) wurde das Chromatogramm mit dem Bio-Imaging Analyzer BAS-1800 (Fujinon (Europe) GmbH, Willich) ausgewertet.

### 2.7.4 Bestimmung von Transportraten

Zur Bestimmung von Glycinbetain-Aufnahmeraten wurde die schnelle Membranfiltration angewendet. Die Aufnahme wurde mit 250  $\mu\text{M}$  [Methyl- $^{14}\text{C}$ ]-Glycinbetain gestartet (ca. 3,7 kBq). Anschließend wurden innerhalb von zwei Minuten fünfmal jeweils 200  $\mu\text{l}$  des Messansatzes auf Glasfaserfilter einer Mehrfachfiltrationsanlage (Modell: FH 225, Pharmacia Biotech. Inc., San Francisco, USA) gegeben. Während das Medium abgesaugt wurde, blieben die Zellen/Proteoliposomen nach zweimaligem Waschen mit 2,5 ml 0,1 M LiCl-Lösung auf dem Filter zurück. Zur Ermittlung der Gesamtradioaktivität im Reaktionsansatz wurden weitere 200  $\mu\text{l}$  Lösung direkt in ein Szintillationsgefäß gegeben. Dessen Inhalt und die Filter wurden jeweils mit 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und in einem Szintillationszähler (LS 6500, Beckman Coulter Inc., Unterschleissheim-Lohhof) ausgewertet. Durch die lineare Auftragung der Zeit gegen die gemessene Radioaktivität lässt sich mit Hilfe der erhaltenen Steigung die Transportgeschwindigkeit berechnen (2.11):

$$\text{sp.T.} = \frac{\text{dpm} \times [\text{GB}]}{\text{dpm}_{\text{gesamt}} \times P \times F \times \text{OD}} \quad (2.11)$$

sp.T. = spezifische Transportrate [ $\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg NG}^{-1}$ ]

dpm = Zerfälle pro Minute [ $2,2 \times 10^6 \text{ dpm} = 1 \mu\text{c}$ ]

[GB] = Glycinbetaingehalt im Probenvolumen [ $\text{nmol/ml}$ ]

$\text{dpm}_{\text{gesamt}}$  = Gesamte Radioaktivität im Probenvolumen

P = Entnahmemenge [0,2 ml]

F = Trockengewichtsfaktor für *C. glutamicum* [0,36 mg/ml]

### 2.7.5 Untersuchung der Glycinbetain-Aufnahme in Proteoliposomen

15  $\mu\text{l}$  Proteoliposomen wurde mit 100 mM  $\text{KP}_i$  (pH 7,5) auf ein Volumen von 500  $\mu\text{l}$  aufgefüllt, dreizehnmal extrudiert, mit dem gleichen Puffer auf ein Volumen von 3 ml aufgefüllt und zentrifugiert (400.000 g, 20 min, 15 °C). Die Proteoliposomen wurden in einem geringen Volumen resuspendiert und bei allen weiteren Schritten bei Temperaturen über 15 °C behandelt. Zur Untersuchung der Transportaktivität von BetP wurde ein externer Puffer verwendet, der in der Regel entweder 20 mM  $\text{NaP}_i$  (pH 7,5), 25 mM NaCl oder 100 mM Tris/Mes (pH 7,5), 15 mM NaCl enthielt. Die gewünschte Osmolarität wurde mit NaCl oder Sorbitol eingestellt. Während der Transportmessung wurden 500  $\mu\text{l}$  an externem Puffer 15  $\mu\text{M}$  [Methyl- $^{14}\text{C}$ ]-Glycinbetain und 0,1  $\mu\text{M}$  Valinomycin zugesetzt. Zum Starten der Reaktion wurden dem Ansatz, der bei RT gerührt wurde, 2,5  $\mu\text{l}$  Proteoliposomen hinzugegeben. Die weitere Bearbeitung erfolgte nach den allgemeinen Bestimmungen der Transportraten (siehe 2.7.4).

### 2.7.6 Transportuntersuchung an festkörperunterstützten Membranen

Der Transport von Glycinbetain durch BetP ist gekoppelt an den Symport von zwei Natriumionen. Dieser Transport von zwei Ladungen kann mit Hilfe der festkörperunterstützten Membranen (SSM = *surface supported membrane*) in der Arbeitsgruppe K. Fendler / E. Bamberg am MPI für Biophysik in Frankfurt/M. untersucht werden. Dazu werden Proteoliposomen an eine Lipiddoppelschicht adsorbiert, die als Kondensator in einem elektrischen Stromkreis abgegriffen wird [Fendler *et al.*, 1996]. Die Lipiddoppelschicht aus Diphytanoyl-Phosphatidylcholin (Avanti Polar Lipids Inc., USA) wurde dazu auf einer Platte mit Gold-Chrom-Legierung aufgezogen, an die vorher Oktadecanthiol chemisorbiert wurde [Seifert *et al.*, 1993]. Die Qualität der Membran wurde dann kapazitiv untersucht. Dazu wurde die Lipiddoppelschicht mit 100 mM  $\text{KP}_i$ -Puffer + 10 nM Valinomycin (pH 7,5) im Gleichstromkreis vermessen. Dabei sollte das Verhältnis Leitfähigkeit/Kapazität  $< 1$  sein. Anschließend wurde 10  $\mu\text{l}$

Proteoliposomen mit einem Lipid/Protein-Verhältnis von 10:1 (w/w) in 500 µl  $\text{KP}_i$ -Puffer (100 mM, pH 7,5) aufgenommen und dreizehnmal extrudiert. Nach 20 minütiger Zentrifugation (400.000 g, RT) wurden die Proteoliposomen in 40 µl  $\text{KP}_i$ -Puffer aufgenommen und 30 µl in die Zelle mit der Lipidoberfläche gegeben. Die Anbindung erfolgte innerhalb von 20 min. Die Anbindung wurde mit Hilfe der Leitfähigkeit untersucht. Diese sollte im Bereich von  $< 1$  nS liegen, die Kapazität bei ca. 4 nF/cm<sup>2</sup>. Die Messzelle wurde äquilibriert mit 100 mM Tris/Mes-Puffer (pH 7,5) + 10 nM Valinomycin. Zur Aktivierung von BetP wurde vorher mit dem gleichen Puffer und 250 mM NaCl gespült und anschließend zusätzlich mit 15 µM Glycinbetain im selben Puffer gestartet. Eine zweite Möglichkeit war die Vorbehandlung mit 100 mM Tris/Mes-Puffer (pH 7,5) + 60 mM KCl + 8 mM NaCl + 10 nM Valinomycin + 15 µM Glycinbetain und der Start mit 500 mM Sorbitol im gleichen Puffer. Durch die angelegten hyperosmotischen Bedingungen beginnt BetP Glycinbetain und zwei Natriumionen in die Liposomen zu transportieren. Damit erhöht sich die Zahl der positiven Ladungen in den Liposomen und somit am Kondensator. Diese Erhöhung kann durch Aufnahme von Elektronen aus dem angeschlossenen Stromkreis kompensiert werden. Die Aufladung des Kondensators wird mit einem Oszillographen gemessen. Über die Geschwindigkeit der Kondensatoraufladung kann auf die Transportgeschwindigkeit von BetP zurückgerechnet werden.



### 3. ERGEBNISSE

BetP aus *C. glutamicum* enthält eine osmosensorische und osmoregulatorische Funktion. Dabei wird das Aktivierungssignal mit den terminalen cytoplasmatischen Extensionen detektiert und moduliert. Inwieweit die C-terminale Domäne hyperosmotische Bedingungen wahrnimmt und die N-terminale Domäne das Signal moduliert, ist unbekannt. Die Untersuchung der Strukturen beider Extensionen und mögliche Strukturänderungen nach einem Signal sollten eine Erklärung der Vorgänge liefern. Dazu wurden NMR- und CD-Messungen durchgeführt. Mit beiden Methoden sind dynamische Änderungen einer Peptidstruktur messbar. Eine Strukturänderung setzt allerdings eine Bindung oder einen Bindungsverlust nach Eingang des hyperosmotischen Signals voraus. Als Signalgeber und potentiellen Bindungspartner für die C-terminale Extension ist die Lipiddoppelschicht, allerdings auch interne oder externe Osmolyte, denkbar. Die Weiterleitung des Signals kann ebenfalls durch verschiedene Interaktionen erfolgen. Als mögliche Interaktionspartner für den Sensor werden die cytoplasmatischen Schleifen von BetP und die N-terminale Domäne angesehen. Diese möglichen Interaktionen wurden mit Hilfe der *Resonant Mirror*-Spektroskopie untersucht. Anschließend wurden die *in vitro*-Daten anhand von *in vivo*-Messungen unter physiologischen Bedingungen an *C. glutamicum* untersucht. Zu Beginn der Arbeit mussten dazu beide terminalen Domänen durch heterologe Expression synthetisiert werden.

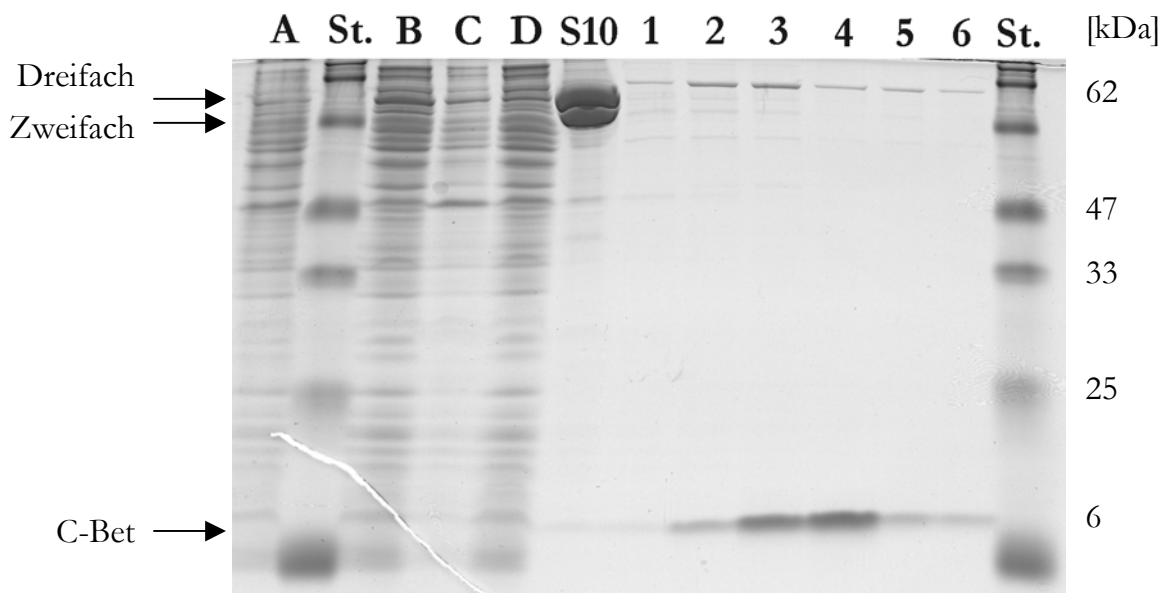
#### 3.1 Peptidreinigung

##### 3.1.1 Anzucht der Zellen

Die Isolation der cytoplasmatischen Extensionen erfolgte nach heterologer Expression der Gene *c-bet* und *n-bet* in *E. coli* ER2566 pTYB2*c-bet/n-bet*. 16 h nach Induktion mit IPTG wurden die Zellen geerntet. Dabei ergaben sich je nach Fermentationsverfahren unterschiedliche Nassgewichte. Aus einem 500 ml Schüttelkolbenansatz wurden Zellen mit 4 g Nassgewicht gewonnen. Aus einer *batch*-Fermentation mit 8 l Medium wurden Zellen mit ca. 40 g Nassgewicht geerntet. Dabei wurde die Anzucht im großen Ansatz nicht optimiert. Im Schüttelkolben wurde die optimale Temperatur von 20 °C eingestellt. Die geringere Zellausbeute im *batch*-Verfahren (5 g/l) im Vergleich zum Schüttelkolbenansatz (8 g/l) wurde allerdings durch den geringeren Arbeitsaufwand kompensiert.

Nach dem Zellaufschluss (**Abb. 3.1**; Fraktion A) befand sich der überwiegende Teil des Dreifachfusionsproteins (Extension, Intein und Chitinbindedomäne) in der löslichen Cytoplasmafraktion (**Abb. 3.1**; Fraktion B). Nach Auftragung der Rohextrakte erfolgte die

selektive Bindung des Fusionsproteins an die Chitinsäule. Nach dem Waschen der Säule war im Durchlauf kein Protein mehr nachweisbar. Nach der Aktivierung des Inteins durch DTT wurde die Extension von dem Fusionsprotein abgespalten und anschließend eluiert. Um hohe Ausbeuten bei der Elution zu erhalten war es notwendig, einen Puffer mit hoher Ionenstärke zu verwenden. Die Schnitteffizienz konnte anhand der Proteinzusammensetzung der Säulenregenerationsfraktionen (1 % SDS) ermittelt werden (S10). Die C-terminale Domäne wurde zu 50 % aus der Dreifachfusion geschnitten (Abb. 3.1; S10) während die N-terminale Domäne bis zu 90 % durch aktiviertes Intein geschnitten werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die Elution wurde mit Hilfe der Proteinbestimmung und SDS-PAGE-Auftragung kontrolliert (Fraktionen 1 – 6; Abb. 3.1). Bis zu 1 mg Protein konnte aus einem Säulenisolationsprozess (4 g Zellen) gewonnen werden.



**Abb. 3.1** Isolierung der C-terminalen Domäne von BetP mit dem IMPACT T7-System. Das SDS-PAGE-Gel (12,5 %) zeigt den Verlauf der Reinigung. **A:** aufgeschlossene Zellen (50 µg); **B:** Cytoplasmafraktion (50 µg); **C:** Zelltrümmer (50 µg); **D:** Durchlauf nach Auftrag der Cytoplasmafraktion auf die Chitinsäule; **S10:** Regenerationsfraktion der Chitinsäule in 1 % SDS (30 µl); **1 - 6:** Elutionsfraktionen von der Chitinsäule (30 µl); **St.:** Proteinstandard; **Dreifach:** Dreifachfusionsprotein; **Zweifach:** Zweifachfusionsprotein; **C-Bet:** C-terminale Domäne.

Neben der Bande für die Extension (Abb. 3.1; C-terminale Extension bei 6 kDa) war eine weitere Bande um 60 kDa zu beobachten. Diese kann durch Oligomerisierung der Extensionen entstanden sein oder eine Verunreinigung darstellen. Zur Entfernung dieser

zweiten Bande und zur Entsalzung wurden die Peptidfraktionen einer Gelfiltration oder einer *Reversed Phase*-Chromatografie unterzogen.

### 3.1.2 Entsalzung der Peptide

Nach der Reinigung der Extensionen mit dem IMPACT-T7-System lagen diese im Puffer mit hoher Ionenstärke (500 mM NaCl im Puffer) und hoher DTT-Konzentration vor. Dieser Puffer war für alle weiteren Untersuchungen ungeeignet und musste daher gegen eine geeignete salzfreie wässrige Lösung getauscht werden. Die Entsalzung erfolgte nach zwei unterschiedlichen Methoden. Entweder wurden zunächst die Salze und das DTT durch eine Gelfiltration entfernt und anschließend das Peptid in einer "Amicon-Zelle" (Ausschlussgröße 1000 Da) konzentriert, oder die Peptide wurden mit einer *Reversed Phase*-Säule gebunden und nach Elution in Methanol/Wasser/Acetat lyophilisiert.

Durch Gelfiltration konnte der größte Anteil an Salzen entfernt werden. Die anschließende Konzentrierung mit der "Amicon-Zelle" führte zu maximal 1 mg/ml Peptid (Daten nicht gezeigt). Häufig ging durch Präzipitation ein großer Teil des Peptids verloren. Die Entfernung des Salzes erfolgte ebenfalls nie vollständig, so dass die so erhaltene C-Extension zwar für CD- und *Resonant Mirror*-Analysen, nicht aber für die Strukturuntersuchungen mit der NMR-Spektroskopie geeignet waren.

Für NMR-spektroskopische Untersuchungen wurden die Elutionsfraktionen mit einer *Reversed Phase*-Säule vom Salz befreit und konnten zusätzlich noch von der zweiten Proteinbande (60 kDa) abgetrennt werden (Daten nicht gezeigt). Die Peptidfraktionen lagen nach Lyophilisation salzfrei als weiße amorphe Substanz vor.

## 3.2 CD-Spektroskopie

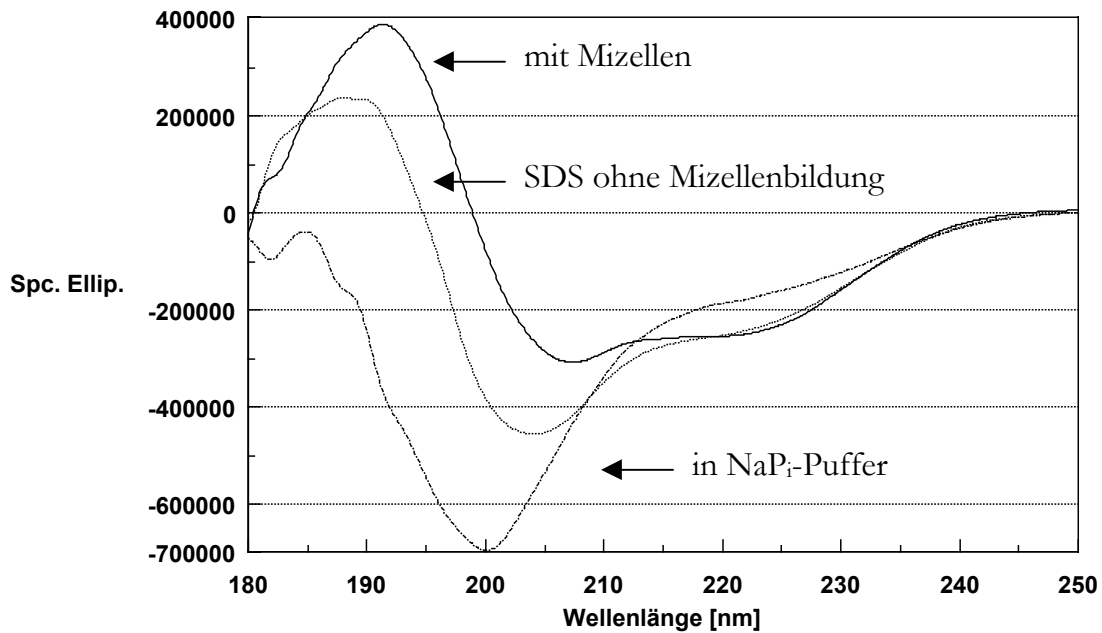
Die terminalen cytoplasmatischen Extensionen von BetP sind an der Detektion der umgebenden osmotischen Bedingungen beteiligt. Die Detektion von sich ändernden Wasseraktivitäten mit diesen Peptiden müsste in einer Struktur- und Affinitätsänderung zu einem Bindungspartner einhergehen. Aus diesem Grund wurden die gereinigten Extensionen mittels CD-Spektroskopie strukturell untersucht. Dabei wurden die Pufferbedingungen variiert. Die C-Extension ist sehr stark positiv (14 Arginine, 4 Lysine) und die N-Extension stark negativ geladen (11 Glutamate, 4 Aspartate). Damit sind beide Peptide in wässrigem Puffer gut löslich. Zur CD-spektroskopischen Untersuchung wurden 300 µl einer 100-300 µg/ml konzentrierten Peptidfraktion in 10 mM NaP<sub>i</sub>-Puffer (pH 6) vermessen.

### 3.2.1 Sekundärstrukturbestimmung der C-terminalen Domäne

Die C-terminale Domäne zeigte in wässriger Lösung nur wenig Sekundärstrukturanteile (**Abb. 3.2**). Es war nur ein schwaches Minimum bei 220 nm zu erkennen und ein starkes bei 200 nm. Da auch das für  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter typische Maximum unterhalb von 200 nm fehlte, kann eine ungefaltete Form des Peptids angenommen werden. Das CD-Spektrum änderte sich nach Zugabe von Detergenzien wie SDS. Dabei zeigten sich zwei Minima bei 208 und 220 nm und ein Maximum bei 193 nm. Diese Extrema sind typisch für  $\alpha$ -helikale Strukturen [Chen *et al.*, 1972; Gans *et al.*, 1991]. Die volle Ausprägung dieser Minima wurde erst erreicht, nachdem die kritische Mizellenkonzentration (cmc) des Detergenz erreicht ist. Für SDS liegt die cmc bei 8,2 mM (2,36 mg/ml). Der Kurvenverlauf deutet auf einen hohen  $\alpha$ -helikalen Anteil im Peptid hin. Die Vorhersagen mit Hilfe der Computerprogramme K2D, contin und selcon ergaben  $\alpha$ -helikale Anteile von weniger als 10 % für die C-Extension ohne Detergenz (**Tab. 3.1**). Die Berechnung der Kurve der C-Extension mit Mizellen ergab für die C-Extension  $\alpha$ -helikale Strukturanteile von 85-99 % (**Tab. 3.2**). Die Strukturbildung erfolgte innerhalb von sechs Minuten und konnte CD-spektroskopisch verfolgt werden (Daten nicht gezeigt).

**Tab. 3.1** Berechnung der sekundären Strukturanteile der C-Extension in NaPi-Puffer. (SS = Sekundärstrukturanteile)

Sek. Struktur, Programme	$\alpha$ -Helix [%]	$\beta$ -Faltblatt [%]	$\beta$ -Schleife [%]	ungeordnet [%]	max. Fehler	$\chi^2$ - Verteilung
K2D	8	45		47	0,08	26,9
contin	5	41	25	29		
selcon	9,8	52	16,5	17,9		96 % SS

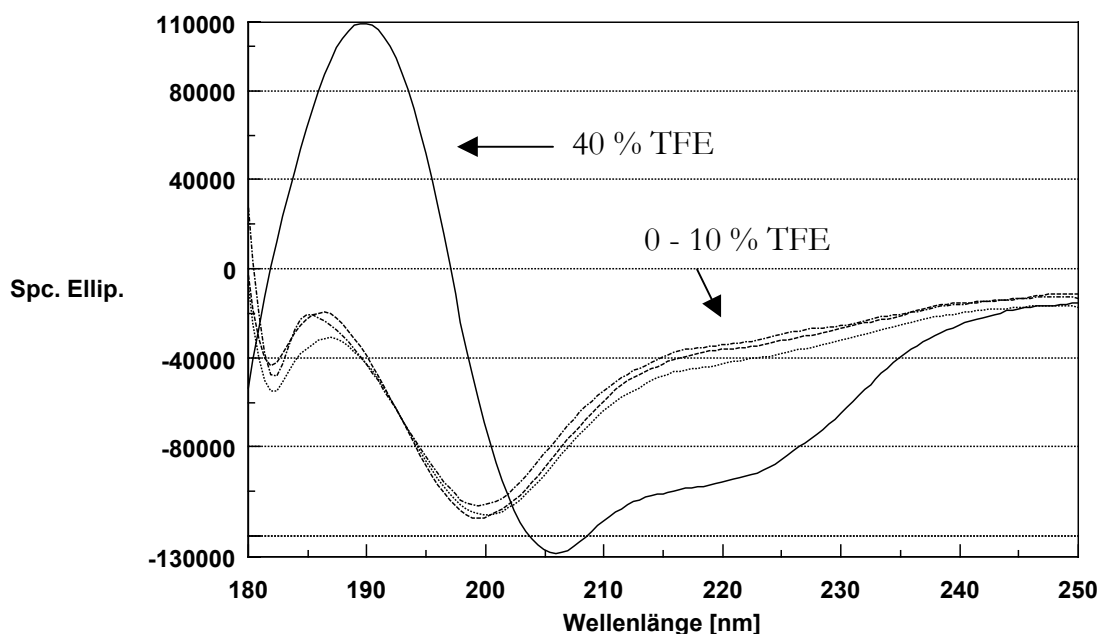


**Abb. 3.2** CD-spektroskopische Untersuchung der C-Extension in 10 mM NaPi (gestrichelte Linie), mit 1,8 mg/ml SDS (punktierte Linie) und in Anwesenheit von SDS-Mizellen (9 mg/ml SDS; durchgezogene Linie).

**Tab. 3.2** Berechnung der Sekundärstrukturanteile der C-Extension in Anwesenheit von Mizellen (SDS). (SS = Sekundärstrukturanteile)

Sek. Struktur, Programme	$\alpha$ -Helix [%]	$\beta$ -Faltblatt [%]	$\beta$ -Schleife [%]	ungeordnet [%]	max. Fehler	$\chi^2$ -Verteilung
K2D	99	0		1	0,227	>100
contin	91	0	3	6		
selcon	85	3	6,3	5,7		96 % SS

Die Induktion der  $\alpha$ -helikalen Struktur durch Zugabe von Mizellen zur C-terminalen Domäne konnte auch in Gegenwart von Detergenzien, wie  $C_{12}E_8$  (cmc = 0,071 mM  $\cong$  38,2 mg/ml) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich ermöglichen hydrophobe Oberflächen die Bildung von  $\alpha$ -helikalen Strukturen in dem Peptid. Um die Fähigkeit zur Ausbildung  $\alpha$ -helikaler Strukturen in wässriger Lösung zu untersuchen, wurde die C-Extension in Anwesenheit von Trifluorethanol (TFE) vermessen. Von dieser Verbindung ist bekannt, dass sie Tertiärstrukturen destabilisiert und  $\alpha$ -helikale Sekundärstrukturen stabilisiert [Ionescu und Matthews, 1999]. Hohe Konzentrationen (40 % TFE) sind sogar in der Lage, ungefaltete Peptide mit Neigung zu  $\alpha$ -helikaler Strukturbildung in eine  $\alpha$ -helikale Struktur zu zwingen.

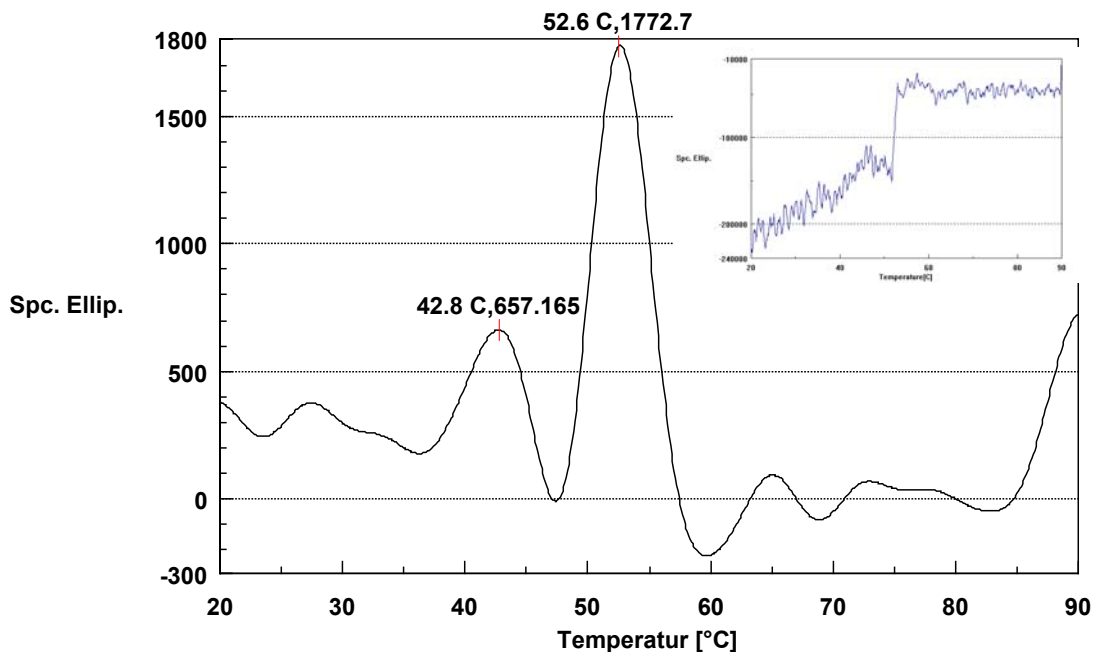


**Abb. 3.3** CD-spektroskopische Untersuchung der C-Extension in Anwesenheit von Trifluorethanol (TFE). C-Extension in NaPi-Puffer (lang-gestrichelte Linie), in 5 % (v/v) TFE (punktierte Linie), 10 % (v/v) TFE (kurz-gestrichelte Linie) und 40 % (v/v) TFE (durchgezogene Linie).

Die Verwendung von TFE wurde zur Kontrolle genutzt, um die maximalen  $\alpha$ -helikalen Strukturanteile in der C-terminalen Domäne zu erzeugen. Dabei zeigte sich, dass bis zu 10 % TFE das Spektrum der C-Extension unverändert blieb. Die C-terminale Domäne enthält somit keine instabilen  $\alpha$ -helikalen Strukturanteile. In Anwesenheit von 40 % TFE wird der maximale Anteil an  $\alpha$ -helikaler Struktur induziert, die aufgrund der Aminosäuresequenz möglich ist (**Abb. 3.3**). Die Berechnung der Spektren mit dem Programm K2D ergab nach Zugabe von bis zu 10 % TFE  $\alpha$ -helikale Strukturanteile unter 10 %. Die Zugabe von 40 % TFE induzierte allerdings maximal 30 %  $\alpha$ -helikale Struktur (**Tab. 3.3**). Die Anwesenheit von Mizellen führt somit zu einer höheren  $\alpha$ -helikalen Strukturbildung in der C-Extension als die Zugabe von TFE. Die (durch TFE) leichtinduzierten  $\alpha$ -helikalen Anteile innerhalb der C-Extension machen nur 30 % der 57 AS aus. Die Wechselwirkung mit einer amphiphilen Oberfläche ist somit erforderlich zur Ausbildung des restlichen  $\alpha$ -helikalen Anteils und damit zur maximalen Sekundärstrukturausbildung in der C-terminalen Domäne.

**Tab. 3.3** Berechnung der Sekundärstrukturanteile der CD-Spektren der C-Extension in Anwesenheit von TFE im NaP<sub>i</sub>-Puffer mit dem Auswertungsprogramm K2D.

Auswertung mit K2D	$\alpha$ -Helix [%]	$\beta$ -Faltblatt [%]	ungeordnet [%]	max. Fehler	X <sup>2</sup> -Verteilung
ohne TFE	8	45	48	0,087	34
+ 5 % TFE	8	41	50	0,182	30
+ 10 % TFE	8	40	52	0,09	42
+ 40 % TFE	28	17	56	0,210	104

**Abb. 3.4** Wendepunktbestimmung des Temperatursprungs von 20 - 90 °C (kleine Grafik) durch Auftragung der Ableitung der spezifischen Elliptizität gegen die Temperatur. Gemessen wurde die C-Extension bei 204 nm.

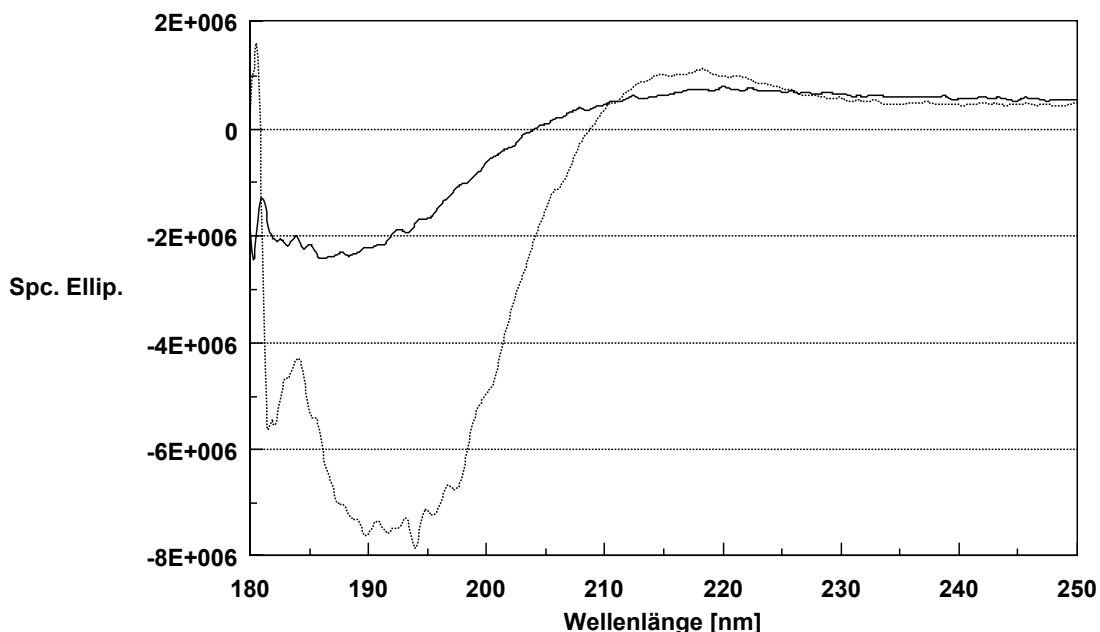
Nachdem die maximale Sekundärstruktur in Anwesenheit von Mizellen ausgebildet war konnte diese durch Verdünnen der Probe unter die kritische Mizellenkonzentration (cmc) nicht mehr zerstört werden. In einigen Fällen war die maximale Sekundärstruktur sogar schon ausgebildet, ohne vorher Mizellen zuzugeben (Daten nicht gezeigt). In diesem Fall wurde versucht, die  $\alpha$ -helikalen Strukturanteile der C-terminalen Domäne durch Temperaturerhöhung zu entfalten. Damit wurde die Stabilität der induzierten  $\alpha$ -helikalen Struktur bestimmt (**Abb. 3.4**). Hierzu wurde die strukturinduzierte C-terminale Domäne von 20 auf 90 °C erhitzt und ein CD-Spektrum bei 204 nm aufgenommen. Dabei löste sich die Struktur bei 52,6 °C spontan auf, nachdem sich das Minimum bei 204 nm vorher langsam verringert hatte. Nach dem Abkühlen wurde die Struktur teilweise zurückgebildet

(Daten nicht gezeigt). Die ausgebildete Struktur der C-terminalen Domäne ist somit reversibel denaturierbar.

### 3.2.2 Sekundärstrukturbestimmung der verkürzten Peptide

Aus Untersuchungen an Deletionsmutanten von BetP in ganzen Zellen ist bekannt, dass das Fehlen von 52 C-terminalen Aminosäuren zur völligen Inaktivierung von BetP in *C. glutamicum* führt. Dagegen bewirkt die C-terminale Verkürzung des Proteins um 12 Aminosäuren eine Verschiebung des Aktivitätsoptimums in den Bereich niedrigerer Osmolarität. Die Deletion von 23 C-terminalen Aminosäuren führt zu einer erniedrigten Affinität zum Cosubstrat  $\text{Na}^+$  und zur Aufhebung der Osmoregulation [Peter, 1997]. Eine Verkürzung der isolierten C-terminalen Domäne muss somit auch ein unterschiedliches Verhalten gegenüber Strukturveränderungen und Bindungspartnern zeigen. Aus diesem Grund wurden drei verschiedene Abschnitte der C-terminalen Extension chemisch synthetisiert und strukturell untersucht.

Die letzten 12 Aminosäuren der C-terminalen Domäne (C-12) zeigten im CD-Spektrum ein komplett entfaltetes Peptid (**Abb. 3.5**).



**Abb. 3.5** CD-spektroskopische Untersuchung der verkürzten C-Extension (C-12) in  $\text{NaP}_i$ -Puffer (punktierte Linie) und in Anwesenheit von Mizellen (SDS; durchgezogene Linie).

Auch in Anwesenheit von Mizellen änderte sich das Spektrum nur unwesentlich. Charakteristisch für ein entfaltetes Peptid ist ein Minimum unterhalb von 200 nm und ein

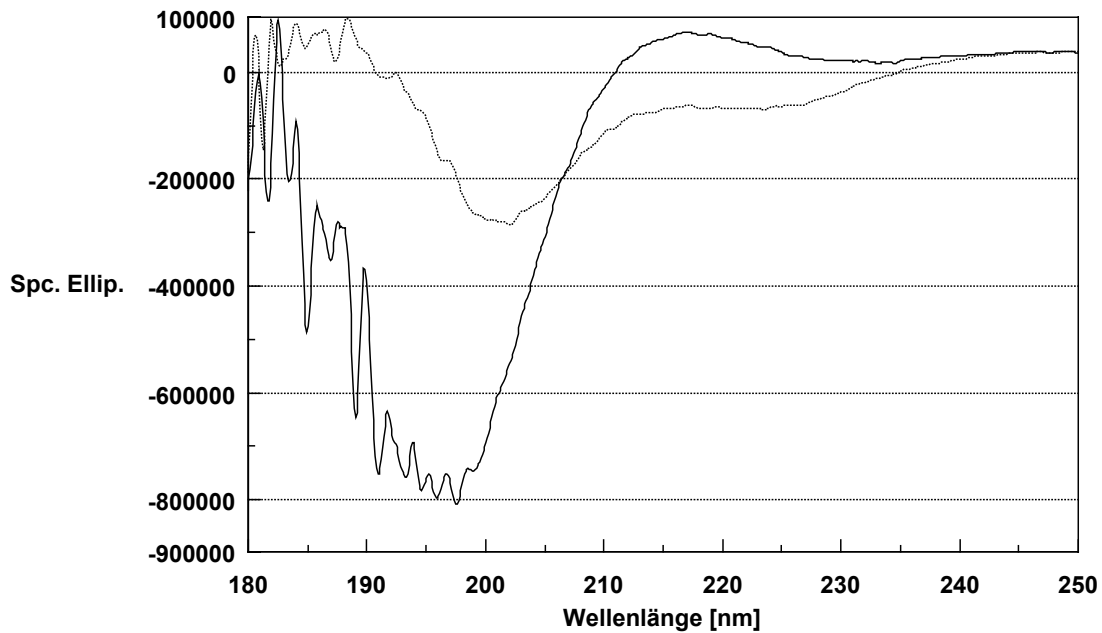


Kurvenverlauf im positiven spezifischen Elliptizitätsbereich oberhalb von 200 nm. Die Berechnung der CD-Spektren der verkürzten C-terminalen Domäne (C-12) ergab ebenfalls keine Sekundärstruktur. Andere Mizellen-bildende Detergenzien, wie C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>, oder die Zugabe von Salzen (NaCl, KCl) führten ebenfalls nicht zu einer Veränderung des Ausgangsspektrums (Daten nicht gezeigt).

Die letzten 21 Aminosäuren der C-terminalen Domäne (C-21) zeigten wie die Fraktion C-12 ebenfalls keine Sekundärstruktur in wässriger Phosphatlösung. Allerdings konnten durch Zugabe von Detergenz (SDS oder C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>) Sekundärstrukturelemente erzeugt werden (**Abb. 3.6**). Die entstehenden Minima (bei 204 und 225 nm) lassen einen geringen  $\alpha$ -helikalen Anteil vermuten. Berechnungen der Spektren führten zu einer Induktion von bis zu 30 %  $\alpha$ -Helix in Anwesenheit von Mizellen. Die Berechnungen enthielten sehr hohe Fehler und konnten nur mit dem Programm K2D bewertet werden (**Tab. 3.4**).

**Tab. 3.4** Berechnung der Sekundärstrukturanteile des Peptids mit den letzten 21 Aminosäuren (C-21) der C-Extension in Anwesenheit von Mizellen und Salz. Die Auswertung erfolgt mit dem Programm K2D.

Auswertung mit K2D	$\alpha$ -Helix [%]	$\beta$ -Faltblatt [%]	ungeordnet [%]	max. Fehler	X <sup>2</sup> -Verteilung
ohne Mizellen	0	0	100	>0,227	11956
mit Mizellen	27	32	41	>0,227	2350
+ NaCl (0,4 M)	2	51	47	>0,227	3974



**Abb. 3.6** CD-Spektren der letzten 21 Aminosäuren der C-terminalen Domäne (C-21) in  $\text{NaPi}_1$ -Puffer (durchgezogene Linie) und in Anwesenheit von Mizellen (9,7 mg/ml SDS; gestrichelte Linie).

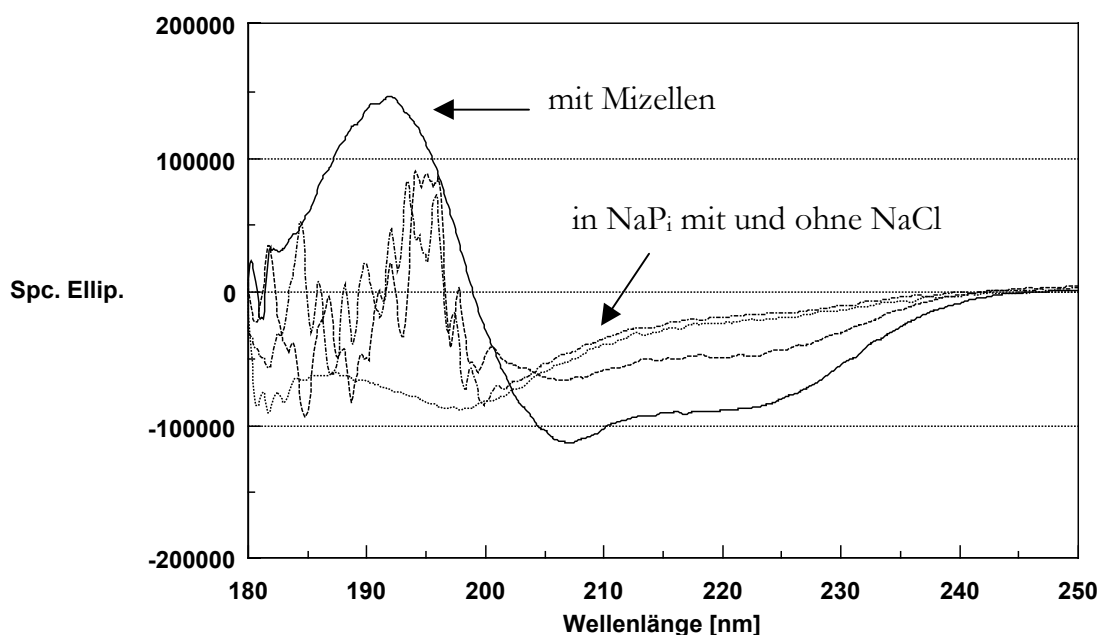
Der Zusatz von Salz (NaCl) führte, wie auch bei der C-12-Verkürzung, nicht zu einer Veränderung des Spektrums. Die Berechnung ergab ebenfalls keine Sekundärstrukturanteile.

Die C-terminale Domäne ohne die letzten 21 Aminosäuren (C-35) wurde ebenfalls chemisch synthetisiert und auf ihre Struktur hin untersucht. In ganzen Zellen führte die Deletion von 23 C-terminalen Aminosäuren zu einer erniedrigten Affinität zum Cosubstrat  $\text{Na}^+$  und zur Aufhebung der Osmoregulation [Peter, 1997]. Veränderungen in der Sekundärstruktur sollten also nichts mit dem Prozess des *osmosensing* zutun haben. Das Peptid zeigte ohne Zugabe von Mizellen im CD schon  $\alpha$ -helikale Struktur (Spektrum nicht gezeigt). Diese veränderte sich in Anwesenheit von Mizellen nicht. Auch nach Zugabe von Salz (NaCl oder KCl) wurde keine Verringerung oder Erhöhung  $\alpha$ -helikale Strukturanteile gemessen und berechnet. Der membranständige Teil der C-terminalen Domäne (C-35) bildet unter allen untersuchten Bedingungen einen hohen  $\alpha$ -helikalen Strukturanteil aus.

### 3.2.3 Sekundärstrukturbestimmung der N-terminalen Domäne

Die N-terminale Domäne übt wahrscheinlich bei der Signalweiterleitung in BetP eine modulierende Funktion aus. Durch Deletion der N-terminalen Domäne wurde in ganzen Zellen eine Verschiebung des Aktivitätsoptimums von BetP in den Bereich höherer

Osmolaritäten gemessen [Peter *et al.*, 1998a]. Die N-terminale Domäne ist somit ebenfalls durch Konformationsänderung oder Interaktion am *osmosensing*-Prozess beteiligt. Die Strukturausbildung der gereinigten N-terminalen Domäne wurde CD-spektroskopisch vermessen. Auch hier zeigte sich in wässriger Lösung keine Sekundärstruktur, diese konnte aber durch amphiphile Oberflächen (SDS und C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>) induziert werden (**Abb. 3.7**). Die Ausbildung einer Sekundärstruktur war allerdings nicht so deutlich wie bei der C-terminalen Domäne. Die Berechnung der Strukturanteile lieferte ohne Detergenzzugabe eine ähnliche Strukturzusammensetzung wie bei der C-Extension, die induzierte Form enthielt allerdings einen  $\alpha$ -helikalen Anteil von maximal 30 % (**Tab. 3.5**).



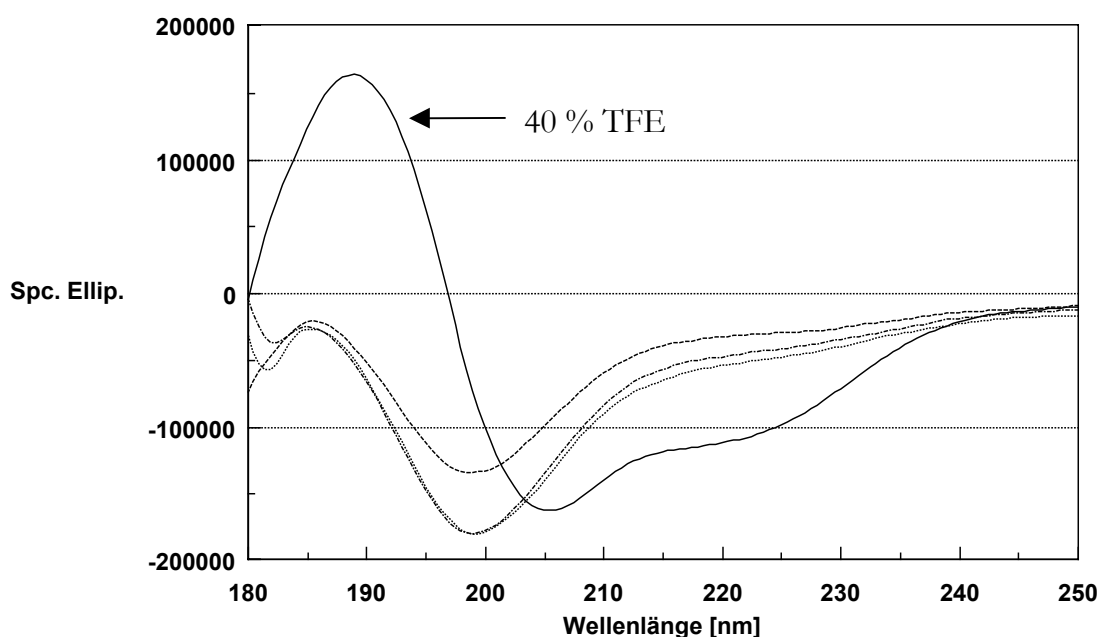
**Abb. 3.7** CD-spektroskopische Untersuchung der N-terminalen Domäne in NaPi-Puffer (punktierter Linie), in NaPi-Puffer + 0,4 M NaCl (kurz-gestrichelt), in Anwesenheit von Mizellen (2,7 mg/ml SDS) und 0,4 M NaCl (lang-gestrichelte Linie) und in SDS (9 mg/ml) ohne Salz (durchgezogene Linie).

Bei der Sekundärstrukturbestimmung der Peptide mit Mizellen wurde der Einfluss unterschiedlicher Lipide auf die N-terminale Domäne verglichen. Die verwendeten Detergenzien unterschieden sich besonders in der Ladung der Kopfgruppen voneinander. Während SDS eine negativ geladene Sulfatgruppe enthält, ist C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> an der Kopfgruppe ungeladen (ethoxylierter Fettalkohol) und DPC (Dodecylphosphorylcholin) positiv geladen (permethylierte Ammoniumgruppe). Die Detergenzien führten zu unterschiedlich starker Induktion der Ausbildung  $\alpha$ -helikaler Anteile bei der N-terminalen Domäne. SDS induzierte die am stärksten ausgeprägte  $\alpha$ -helikale Struktur, gefolgt von DPC, die

schlechteste Induktion erzeugte C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> (Daten nicht gezeigt). Die Kontrolle der Strukturbildung mit TFE führte zu dem gleichen Ergebnis wie bei der C-terminalen Domäne (**Abb. 3.8**).

**Tab. 3.5** Berechnung der Sekundärstrukturanteile der N-terminalen Domäne in Anwesenheit von Detergenzien. Die Berechnung erfolgte mit K2D

Auswertung mit K2D	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt	ungeordnet	Fehler	X <sup>2</sup> -Verteilung
in NaP <sub>i</sub>	7	50	43	>0,227	153
+ SDS	26	15	58	0,097	49
+ 0,4 M NaCl	7	50	42	>0,227	210
+ NaCl + SDS	4	48	48	>0,227	1469



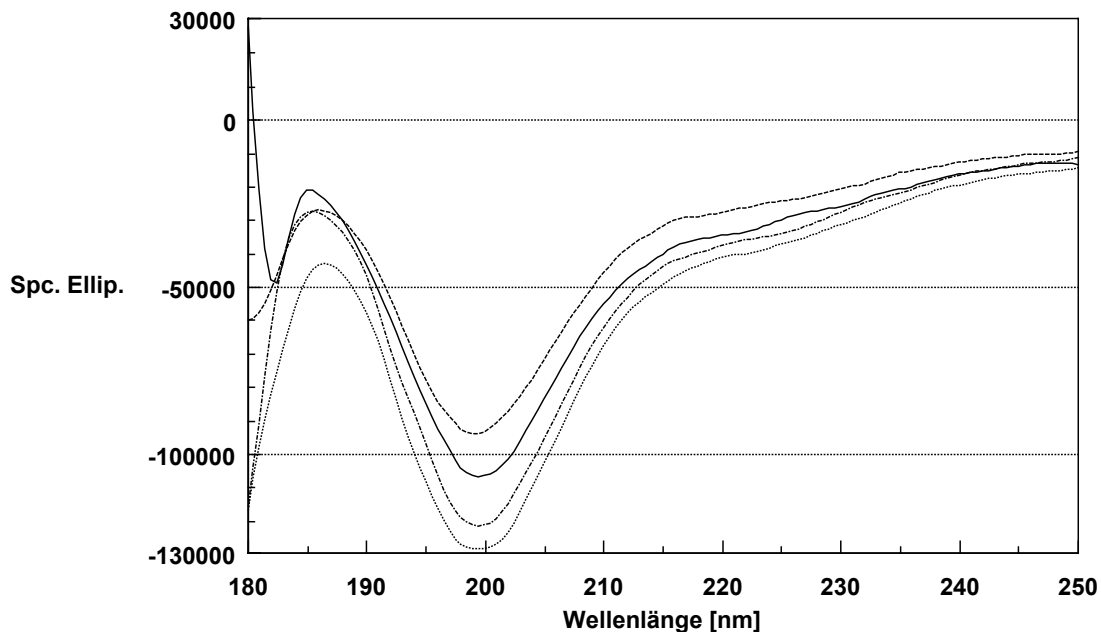
**Abb. 3.8** CD-spektroskopische Untersuchung der N-Extension in Anwesenheit von TFE. Vergleich in NaP<sub>i</sub>-Puffer (punktierte Linie), in 5 % TFE (lang-gstrichelte Linie), 10 % TFE (kurz-gstrichelte Linie) und 40 % TFE (durchgezogene Linie).

Im Vergleich zur C-terminalen Domäne ist die N-Extension weniger stark induzierbar. Sie faltet sich unterschiedlich stark in Abhängigkeit von der Ladung der Lipidkopfgruppen und dabei insgesamt nicht im gesamten Peptid. Die C-terminale Domäne faltet sehr stark unabhängig von der Art der Mizellen. Weitere Faktoren, wie pH-Wert-Änderung, führten nicht zu einer Strukturbildung. Weder die C-terminale

Extension noch die N-terminale Extension veränderten ihr typisches CD-Spektrum bei pH-Werten von 4,5 und 9,6 im Vergleich zu pH 7 (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.4 Sekundärstrukturbestimmung von Peptidgemischen

Die Signalübertragung "Osmostress" könnte auch über eine Wechselwirkung der N-terminalen und C-terminalen Domänen erfolgen, die mit einer Strukturveränderung verbunden sein könnte. Dazu wurde die C-terminale Domäne und die N-terminale Domäne in unterschiedlichen molaren Mischungsverhältnissen in wässriger Lösung untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass sich die Einzelstrukturen nicht änderten und die Summe der beiden Strukturen als CD-Spektrum zu beobachten war (**Abb. 3.9**). Auch die Berechnung der Gemische führte zu keiner Sekundärstrukturvorhersage.



**Abb. 3.9** CD-Spektren der Gemische aus C-Extension und N-Extension in NaPi-Puffer. N-Extension/C-Extension im Verhältnis 1:1 (lang-gestrichelte Linie), 1:2 (kurz-gestrichelte Linie), 1:4 (punktierte Linie) und die C-Extension alleine (durchgezogene Linie).

Die Berechnung der Spektren ergab für das Gemisch  $\alpha$ -helikale Anteile von 0 - 9 % (berechnet mit K2D, contin und selcon; Daten nicht gezeigt).

Auf der Suche nach weiteren Strukturstabilisatoren oder Interaktionspartnern des C-terminalen Sensors von BetP wurde die C-Extension mit verschiedenen möglichen Interaktionspartnern gemischt. Dabei ergaben Interaktionsbestimmungen mittels *Resonant Mirror*-Spektroskopie (3.6.2), dass der cytoplasmatische Schleife 8 von BetP eine

erhöhte Affinität zur C-Extension hat. Ebenfalls konnte die Interaktion zu Membranoberflächen mit Kopfgruppen, wie Ethanolamin, quantifiziert werden. Aus diesem Grund wurde die C-Extension ebenfalls mit der chemisch synthetisierten cytoplasmatischen Schleife 8 des Transporters sowie mit *random* 8 und Ethanolamin CD-spektroskopisch untersucht. Alle Substanzen konnten keine Struktur in der C-terminalen Domäne induzieren (CD-Spektren nicht gezeigt). Die Berechnung der CD-Spektren, die der C-Extension in wässrigem NaPi-Puffer glichen, ergaben ebenfalls keine Strukturänderung (**Tab. 3.6**). Auch die Anwesenheit von Mizellen in den Proben veränderte die Spektren nicht (Daten nicht gezeigt).

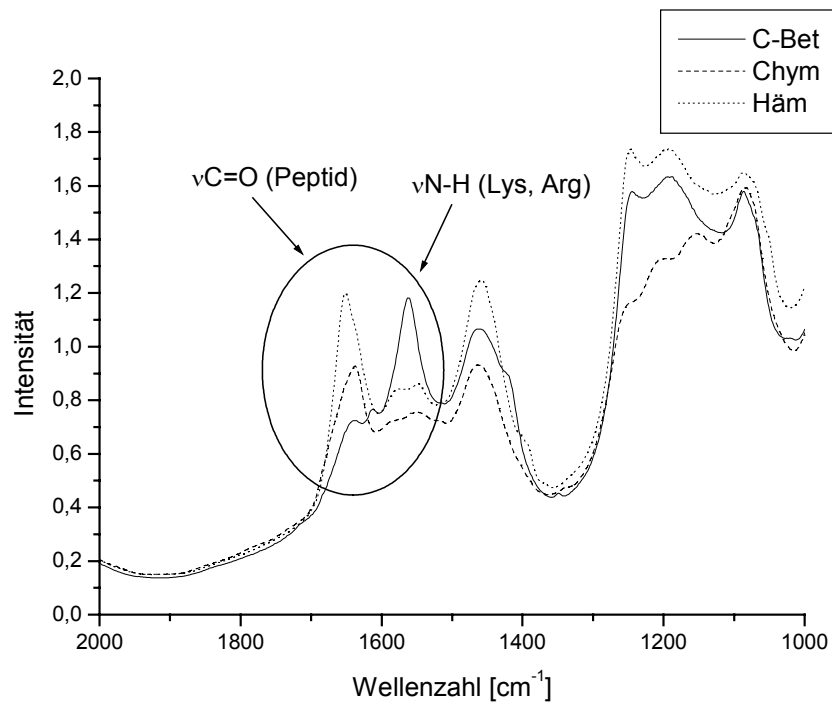
**Tab. 3.6** Berechnung der Sekundärstrukturanteile der C-Extension mit möglichen Interaktionspartnern mittels des Programms K2D. Schleife 8 von BetP und die *random*-synthetisierte Schleife 8 (*random* 8) und Ethanolamin wurden 1:1 in molaren Verhältnissen mit der C-Extension gemischt.

Auswertung mit K2D	$\alpha$ -Helix [%]	$\beta$ -Faltblatt [%]	ungeordnet [%]	max. Fehler	$\chi^2$ -Verteilung
+ Schleife 8	9	35	56	<0,227	43
+ <i>random</i> 8	13	32	56	<0,227	85
+ Ethanolamin	9	39	51	>0,227	273

### 3.3 FT-IR-Spektroskopie

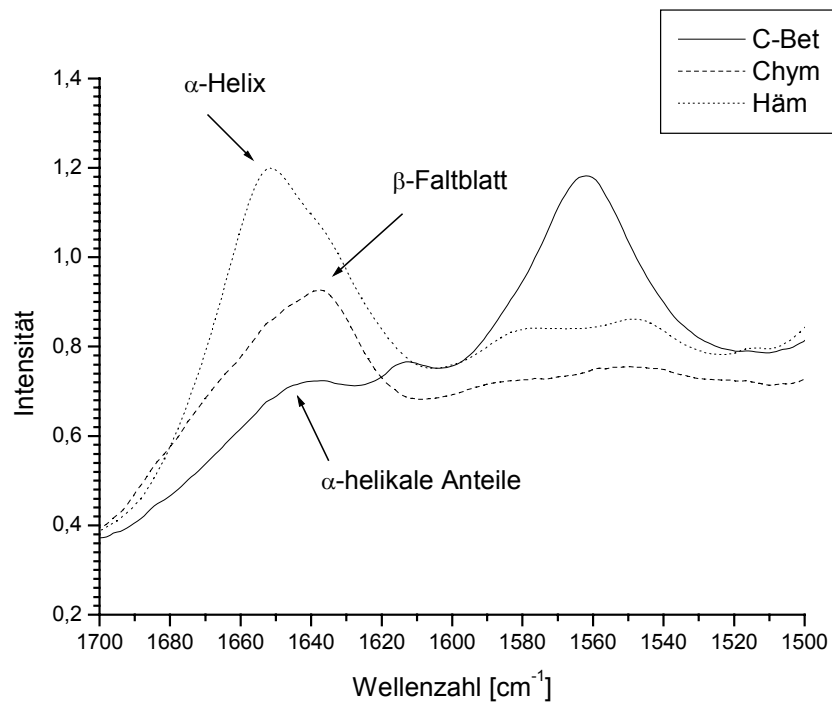
Die FT-IR-Spektroskopie eignet sich ebenso wie die CD-Spektroskopie zur Sekundärstrukturvorhersage von Proteinen und Peptiden. Im Gegensatz zur CD-Spektroskopie ist die Berechnung von  $\beta$ -Faltblatt-Anteilen wesentlich genauer als die Berechnung von  $\alpha$ -helikalen Strukturen. Bei der CD-Spektroskopie stören weiterhin Moleküle und salzreiche Lösungen, die im nahen UV absorbieren und damit das Spektrum überlagern. Mit FT-IR-Spektroskopie sind solche Lösungen problemlos messbar. Bei der Strukturvorhersage von Proteinen und Peptiden mittels FT-IR-Spektroskopie wird die Fläche der Amid-I-Bande berechnet. Diese besteht zu 80 % aus C-O-Streckschwingungen und zu 20 % aus C-N-Streck- und N-H-Biegeschwingungen. Charakteristische Amid-I-Banden Frequenzen von  $\beta$ -Faltblättern liegen bei 1621 - 1627  $\text{cm}^{-1}$ , 1628 - 1634  $\text{cm}^{-1}$  und bei 1635 - 1640  $\text{cm}^{-1}$ . Bei  $\alpha$ -Helices verschiebt sich die Bandenstruktur in Richtung 1651 - 1657  $\text{cm}^{-1}$ . Im Bereich um 1650  $\text{cm}^{-1}$  liegen allerdings auch die typischen Banden für *random coil* (1641 - 1647  $\text{cm}^{-1}$ ) und *turns* und *bends* (1658 - 1666  $\text{cm}^{-1}$ ). Dies führt zu ungenauen Berechnungen für  $\alpha$ -helikale Anteile. Weiterhin

werden verschiedene Seitenketten, wie z.B. Lysin und Arginin ( $\text{NH}_3^+$ -Deformationsschwingungen), angeregt. Diese Aminosäuren stören besonders bei kleinen Peptiden, welche nur schwache C-O-Streckschwingungen des Peptidrückgrates zeigen [Susi *et al.*, 1985]. Die Sekundärstrukturbestimmung der C-terminalen Domäne konnte somit nur abgeschätzt werden.



**Abb. 3.10** FT-IR-Spektren von Hämoglobin (Häm), Chymotrypsin (Chym) und der C-terminalen Domäne (C-Bet) im Bereich von 2000 - 1000  $\text{cm}^{-1}$ .

Neben der C-terminalen Domäne wurden als Vergleichsproteine Chymotrypsin und Hämoglobin untersucht. Von jedem Protein wurde 1 - 2 mg in 1 ml  $\text{D}_2\text{O}$  gelöst und ein Spektrum aufgenommen (**Abb. 3.10**). Die Berechnung der Amid-I-Bande für die Vergleichsproteine ergab für Chymotrypsin einen  $\beta$ -Faltblatt-Anteil von 47 % [Literaturwerte: 10 %  $\alpha$ -Helix, 34 %  $\beta$ -Faltblatt, 20 %  $\beta$ -turn, 36 % andere Struktur; Torres und Padros, 1995]. Für Hämoglobin wurde ein  $\alpha$ -helikaler Anteil von 80 % bestimmt [Literaturwert: 75 %  $\alpha$ -Helix, 0 %  $\beta$ -Faltblatt, 14 %  $\beta$ -turn, 11 % andere Struktur; Susi *et al.*, 1985]. Das Maximum der Amid-I-Bande für die C-Extension liegt bei 1640  $\text{cm}^{-1}$  und zeigt somit geringe  $\beta$ -Faltblattanteile (**Abb. 3.11**). Dies bestätigt die CD- und NMR-spektroskopischen Ergebnisse, dass die C-terminale Domäne als Sekundärstrukturanteile hauptsächlich  $\alpha$ -Helices oder *random coil* und kein  $\beta$ -Faltblatt ausbildet.



**Abb. 3.11** FT-IR-Spektren von Hämoglobin (Häm), Chymotrypsin (Chym) und der C-terminalen Domäne (C-Bet) im Bereich von 1700 - 1500  $\text{cm}^{-1}$ . Ausschnittsvergrößerung

### 3.4 NMR-Spektroskopie

Die Funktion des Osmosensors (C-terminale Domäne) und des Modulators (N-terminale Domäne) wird im cytoplasmatischen Raum der Zelle ausgeübt. Die sich ändernden osmotischen Bedingungen bewirken in der Zelle dynamische Veränderungen, wie Änderung des Turgors, Schrumpfen oder Expandieren der Zelle und Stauchen oder Dehnen der BetP-beinhaltenden Cytoplasmamembran. Diese Dynamik kann nur durch dynamische Veränderungen der Extensionen detektiert und damit die Aktivität von BetP abgestimmt werden. Solche dynamischen Prozesse (Konformationsänderungen und Bewegungen) können mit der Röntgenkristallographie nicht sichtbar gemacht werden. Mit der NMR-Technik ist es allerdings möglich solche dynamischen Prozesse zeitaufgelöst zu messen. Im Gegensatz zur Röntgenkristallographie besitzt die NMR-Spektroskopie den weiteren Vorteil, dass die Untersuchungen in wässriger Phase oder sogar *in vivo* durchführbar sind. Aufgrund der CD-Daten ist gesichert, dass beide wasserlöslichen Domänen keine stabile Struktur besitzen, sondern flexibel sind. Diese dynamische Flexibilität sollte mit der NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden.



Die Untersuchungen wurden in der Abteilung Grzcesiek in Basel von Hans-Jürgen Sass durchgeführt. Dazu wurden 1 - 2 mg Peptid (1 mM), gelöst in D<sub>2</sub>O, benötigt. Aufgenommen wurden die <sup>1</sup>H-Verschiebungen der Peptid-Protonen bei pH 6 und 298 K. Dabei ist im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der C-Extension in wässrigem Phosphatpuffer gut zu erkennen, dass der größte Teil der Signale im Bereich von 7,7 - 8,5 ppm verschoben ist (siehe Anhang **Abb. 6.1**). Dies deutet daraufhin, dass keine Sekundärstruktur vorhanden ist. Nach Zugabe von 48 mM SDS verschieben sich die Signale zu hohem Feld und eine Signalverbreiterung ist zu beobachten. Die Verbreiterung der Signale ist durch Interaktion der C-terminalen Domäne mit den Mizellen zu erklären. Die Verschiebung der <sup>1</sup>H-NMR-Signale zu hohem Feld deutet auf die Bildung von Sekundärstrukturanteilen hin. Die genauere Bestimmung von Sekundärstrukturanteilen ist nur möglich, indem der Kern-Overhauser-Effekt (NOE) ausgenutzt wird, d. h. die Wechselwirkung der <sup>1</sup>H-Protonen des Peptids über den Raum mit den Nachbar-Aminosäuren in Form von Signalen im zweidimensionalen Spektrum sichtbar wird. Dazu wurde ein 2D-NOE-Spektrum gemessen. Bei einer ausgebildeten Sekundärstruktur wechselwirken viele Protonen der Aminosäuren im Peptid miteinander und entlang der Diagonalen werden Signale sichtbar, die rechtwinklig zur Diagonalen verbunden werden können. Signale, die auf der Diagonalen liegen, spiegeln die Resonanz eines Protons auf sich selber durch die zweidimensionale Auftragung. Signale orthogonal zur diagonalen Linie deuten auf eine NOE-Kopplung räumlich benachbarter Protonen hin. Somit müssen zwei Protonen verschiedener Verschiebung über diese Verbindung als Nachbarn kenntlich gemacht werden.

Im 2D-NOE-Spektrum der C-terminalen Domäne wird allerdings leicht deutlich, dass nur wenige Protonen außerhalb der Diagonalen Signale erzeugt haben, somit also nicht mit einem Nachbarn wechselwirken und ein entfaltetes Peptid beschreiben (siehe **Abb. 6.8**). In Anwesenheit von SDS-Mizellen sind im Bereich von 7,6 - 8,5 ppm mehr Signale zu sehen. Dies deutet auf die Bildung von Sekundärstrukturanteilen hin. Die Zahl der Signale ist allerdings zu schwach, um eine stabile Sekundärstruktur ( $\alpha$ -Helix oder  $\beta$ -Faltblatt) zuzuordnen (siehe **Abb. 6.9**). Deshalb konnten kaum diskrete Signale detektiert werden.

Die Affinität der C-terminalen Domäne wurde weiter mit der NMR-Spektroskopie untersucht, indem einzelne Verkürzungen vermessen wurden. Die letzten 12 Aminosäuren der C-terminalen Domäne (C-12) zeigten im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum unabhängig von der Zugabe von Mizellen (SDS oder DPC) exakt die gleichen Verschiebungen und eine Signalverbreiterung ist nicht zu erkennen (**Abb. 6.3**). Das Peptid C-12 bindet somit nicht an die Mizellen und bildet auch nur wenig Sekundärstruktur aus. Die 21 Aminosäuren lange Verkürzung der C-terminalen Domäne

(C-21) zeigt ebenfalls im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum keine Verschiebung der Signale in Abhängigkeit von Mizellen (**Abb. 6.4**). Auch hier liegen die Hauptsignale im Bereich von 8,5 - 8 ppm und deuten nicht auf eine vorhandene Struktur hin. Das Peptid mit den 35 Aminosäuren vom Ende der letzten putativen Transmembranhelix in Richtung des Endes der C-terminalen Domäne (C-35) zeigt im  $^1\text{H}$ -NMR ein anderes Bild, als die Verkürzungen C-12 und C-21. Ohne Mizellen sind auch hier die meisten Signale im Bereich von 7,6 - 8,5 ppm zu erkennen. Mit Mizellen ist allerdings eine Signalverbreiterung wie in den Spektren der C-terminalen Domäne zu sehen (**Abb. 6.5** und **Abb. 6.6**). Das Peptid C-35 bindet an die Mizellen. Weiterhin verschieben sich mit Bindung an die Mizellen die Signalverschiebungen hin zu höherem Feld und lassen Sekundärstrukturbildung erkennen. Die Induktion von Sekundärstruktur wird im 2D-NOE-Spektrum sichtbar. Ohne Mizellen sind im Bereich 7,6 - 8,5 ppm nur wenige Signale zu finden (**Abb. 6.10**), d. h., es gibt nur wenige Protonen, die über den Raum mit einem benachbarten Proton wechselwirken. Nach Zugabe von SDS oder DPC sind wesentlich mehr Protonensignale in diesem Bereich zu finden (**Abb. 6.11** und **Abb. 6.12**). Durch die Erhöhung des  $\alpha$ -helikalen Strukturanteils werden mehr Wechselwirkungen der Aminosäureprotonen wirksam.

Die Untersuchung der N-terminalen Domäne ergab ebenfalls keine Sekundärstruktur in wässriger Lösung, erst mit Zugabe von SDS-Mizellen wurde eine Signalverbreiterung beobachtet (siehe **Abb. 6.2**). Die Signale zeigten allerdings keine Veränderung in der  $^1\text{H}$ -Verschiebung. Die N-terminale Domäne bindet somit an die Mizellen, verändert dabei aber nicht messbar ihre Sekundärstruktur.

Die NMR-Daten zeigen eindeutig, daß beide Extensionen (C-terminal und N-terminal) in wässriger Lösung keine Struktur ausbilden. Erst die Anwesenheit von amphiphilen Oberflächen ermöglicht eine Anbindung und führt zu der Ausbildung von  $\alpha$ -helikalen Strukturanteilen durch die Zunahme der Signale im Bereich von 7,6 - 8,5 ppm. Dabei ist allerdings nicht im gesamten Peptid eine Sekundärstruktur zu erkennen, sondern nur in Teilbereichen. Die Anzahl der Aminosäuren, die eine  $\alpha$ -Helix ausbilden, konnte nicht bestimmt werden. In der C-terminalen Domäne kann allerdings aufgrund der Untersuchung von drei verkürzten Peptiden dieser Domäne ausgeschlossen werden, dass die letzten 21 Aminosäuren stabile Sekundärstrukturanteile ausbilden. Sie binden auch nicht an amphiphile Oberflächen. Die  $\alpha$ -Helices in der C-terminalen Domäne werden innerhalb der ersten 35 Aminosäuren von der letzten Transmembranhelix aus eingebracht und beinhalten auch die Bindungsstelle zur Oberfläche.

Die mit *Resonant Mirror*-Spektroskopie durchgeführten Interaktionsstudien zeigten eindeutig, dass KCl die Anbindung der C-terminalen Domäne an amphiphile Oberflächen

unterbindet (3.6.2). Überträgt man diesen Befund auf Messungen im *in vitro*-System (BetP in Liposomen), sollte auch hier die Aktivierung, die durch eine hohe interne Kaliumkonzentration hervorgerufen wird, mit der Ablösung der C-terminalen Domäne von der Membran im Zusammenhang stehen [Rübenhagen *et al.*, 2001]. Der Nachweis, dass der Anbindungsverlust der C-terminalen Domäne von Mizellen mit einer Konformationsänderung der Sekundärstruktur zutun hat, sollte mit der NMR-Spektroskopie gezeigt werden. Dazu wurde zuerst der membrannaher Teil der C-Extension (C-35) vermessen. Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren vom Peptid C-35 zeigten mit und ohne KCl (300 mM) in Anwesenheit von DPC-Mizellen nur wenig Veränderungen in den Signalverschiebungen (**Abb. 6.7**). Die 2D-NOE-Spektren der C-35-Fraktion mit DPC und KCl zeigten eine Abnahme der Signale im gesamten Feldbereich und deuten damit Strukturveränderungen an (**Abb. 6.13**). Die Aufnahme der Spektren bei tieferen Temperaturen (278 K) sollte die Bewegung des Peptids unterbinden und so stärkere Signale sichtbar werden lassen. Allerdings konnte damit keine genauere Aussage zur Strukturveränderung von C-35 durch KCl gemacht werden (Daten nicht gezeigt). Die Interaktions-verändernden Eigenschaften von KCl wurden an der Verkürzung C-35 bestätigt. Das Peptid C-35 verändert in Anwesenheit von 300 mM KCl seine stabile Sekundärstruktur geringfügig und ist damit in der Lage die Konformation der kompletten C-terminalen Extension zu verändern.

### 3.5 Dynamische Lichtstreuung

Nachdem eine strukturelle Veränderung in der C-terminalen und N-terminalen Extension in Anwesenheit von amphiphilen Oberflächen zu beobachten war (siehe 3.2.1 und 3.2.3) sollte mit Hilfe der Dynamischen Lichtstreuung (*light scattering*) die direkte Anlagerung der Extensionen an diese Oberflächen untersucht werden. Dabei ist es möglich, Partikelgrößen zu berechnen und dabei die Anzahl und das Verhältnis von Bindungspartnern zueinander zu bestimmen. Zuerst wurde die Anlagerung der C-terminalen Domäne an eine amphipatische Oberfläche (C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>-Mizelle) untersucht. Weiterhin sollte festgestellt werden, ob die Extensionen in Anwesenheit von Mizellen mit weiteren Peptiden interagieren. Weil in Interaktionsuntersuchungen eine hohe Affinität zwischen der C-Extension und der cytoplasmatischen Schleife 8 von BetP beobachtet worden war (3.6.2), sollte diese Interaktion durch Partikelgrößenberechnung sichtbar werden. Hierzu wurden C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>-Mizellen eingesetzt, deren Mizellengröße und -form bekannt war (120 Monomere/Mizelle  $\cong$  62 kDa). Die Größe der Mizellen wurde auf 39 kDa berechnet, was 63 % der erwarteten Größe entspricht (**Tab. 3.7**). Mit der C-terminalen Domäne im Verhältnis 1:1 zur Mizelle vergrößerte sich die berechnete Mizelle annähernd um die Größe der C-Extension (6 kDa).

**Tab. 3.7** Untersuchung der Dynamischen Lichtstreuung von Mizellen (C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>) mit unterschiedlichen assoziierten Peptiden (Substanzgemische mit jeweils gleicher Teilchenzahl). **SOS**: *sum of squares* (Summe der Fehlerquadrate)

Fraktion	Mizelle [kDa]	Radius [nm]	Basislinie	SOS-Error	Zählrate [cts/s]
C <sub>12</sub> E <sub>8</sub> (38 mg/ml)	39	2,9 ± 0,3	1.000	0,412	529
C <sub>12</sub> E <sub>8</sub> (19 mg/ml) C-Bet (0,1 mg/ml)	44	3,1 ± 0,2	1.000	0,222	351
C <sub>12</sub> E <sub>8</sub> (13 mg/ml) C-Bet (76 µg/ml) N-Bet (45,5 µg/ml)	46	3,1 ± 0,3	1.000	0,211	214
C <sub>12</sub> E <sub>8</sub> (17 mg/ml) C-Bet (0,1 mg/ml) Schleife 8 (0,2 mg/ml)	48	3,2 ± 0,4	1.000	0,289	235

Die Vermessung einer reinen Lösung aus N- oder C-terminaler Domäne ergaben, wie auch einer Lösung mit der Schleife 8, keine Partikelgrößen da diese als Monomere zu klein sind. Die Zugabe der C-Extension zu den C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>-Mizellen im gleichen Verhältnis führte zu einer Vergrößerung der berechneten Mizelle von 39 auf 44 kDa. Dies entspricht der Größe der C-terminalen Domäne (6 kDa). Die Zugabe der N-Extension zu Mizellen erbrachte keine exakte Partikelgröße, die beiden Komponenten entsprach (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Signal-modulierenden Eigenschaften der N-terminalen Domäne ist zu erwarten, dass diese mit der C-Extension interagiert. Dies sollte ebenfalls durch die Vergrößerung der Partikel aus Mizelle und C-Extension nach Zugabe der N-Extension zu beobachten sein. Dabei zeigte sich aber, dass die bestimmte Partikelgröße kleiner war, als erwartet (46 kDa statt den erwarteten 51 kDa). Eine Interaktion von Loop 8 mit der C-terminalen Domäne wurde ebenfalls quantifiziert und ergab auch mit der Dynamischen Lichtstreuung im Verhältnis 1:1 zu Mizellen die Summe der Partikelgröße aller Komponenten. Die Berechnung ergab eine Partikelvergrößerung durch die C-Extension und der Schleife 8 von 9 kDa. Dies entspricht ungefähr der Summe der Peptidgrößen der einzelnen Peptide (6 kDa und 2 kDa).

Mit der Dynamischen Lichtstreuung konnte die Anlagerung der C-terminalen Domäne an amphiphile Oberflächen nachgewiesen werden. Die Anlagerung der N-terminalen Domäne und der Schleife 8 mit der C-Extension an Mizellen ist allerdings nicht eindeutig gesichert, kann aber weiterhin nicht ausgeschlossen werden.

### 3.6 *Resonant Mirror*-Spektroskopie

Nachdem eine Sekundärstrukturbildung innerhalb der C-terminalen Domäne in Anwesenheit von amphiphilen Oberflächen beobachtet worden war, wurde diese Interaktion *in vitro* mit der *Resonant Mirror*-Spektroskopie untersucht. Durch die Bindung der C-Extension an eine Oberfläche ist vorstellbar, daß das hyperosmotische Signal von *in vivo* von der Lipiddoppelschicht ausgesendet wird. Unter hyperosmotischen Bedingungen sollte sich dann die Affinität zur amphiphilen Oberfläche verändern. Ebenfalls sind mögliche Interaktionen auf dem Weg der Signalweiterleitung mit dieser Methode messbar. Vorstellbar ist, daß, nachdem ein hyperosmotisches Signal vom Sensor (C-terminale Domäne) detektiert wurde, auf Teilbereiche des Transporters übertragen wird, um BetP in den aktiven Zustand zu überführen. Dabei könnten intramolekulare Wechselwirkungen zwischen der C-terminalen Domäne und weiteren cytoplasmatischen Proteindomänen auch im künstlichen System beobachtbar sein. Die N-Extension als Modulator des eingetroffenen Signals oder einer der ins Cytoplasma ragenden Schleifen von BetP könnten dabei den Wechselwirkungspartner darstellen. Diese möglichen intramolekularen Wechselwirkungen wurde mit Hilfe der *Resonant Mirror*-Spektroskopie in Echtzeit untersucht. Dazu mussten zuerst geeignete Oberflächen mit einem der Interaktionspartner hergestellt werden. An diese Oberflächen konnte anschließend die Bindung durch Zugabe des anderen Interaktionspartners quantifiziert werden.

#### 3.6.1 Erzeugung geeigneter Oberflächen

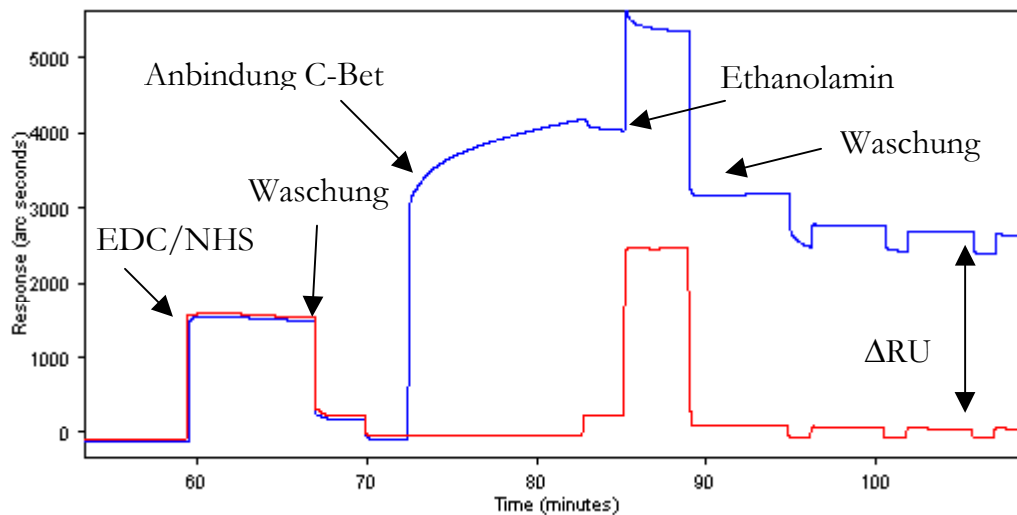
Zur Quantifizierung von Interaktionen wurden unterschiedliche Oberflächen hergestellt. Die Peptid-Peptid-Wechselwirkungen wurden an Oberflächen untersucht, an die vorher C-terminal oder N-terminal ein Interaktionspartner kovalent angebunden wurde. Dazu wurden drei verschiedene Oberflächen (CM, C, und AS) genutzt (siehe Material und Methoden). Für die Belegung mit Lipiden wurden nicht-derivatisierte Oberflächen verwendet.

##### 3.6.1.1 Kovalente Anbindung von Peptiden an aktivierte Oberfläche

Exemplarisch wird hier die Anbindung der C-terminalen Domäne N-terminal an eine Carboxymethyldextran (CM)-Oberfläche beschrieben:

Nach der Aktivierung der Oberfläche mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) ergab die kovalente Anbindung der C-terminalen Domäne (50 µl einer 0,8 mg/ml Lösung in PBS) nach Absättigung der überzähligen Bindungsstellen mit 1 M Ethanolamin eine Massenzunahme (Differenz der *response unit*, ΔRU) von 2460 arcs, was ungefähr 12,3 ng/mm<sup>2</sup> Peptid entspricht (**Abb. 3. 12**). Diese *response units* waren schon so hoch, dass eventuell durch sterische

Wechselwirkung der angebotenen Extensionen untereinander der Bindungspartner nicht mehr binden konnte. Optimale *response units* lagen zwischen 1 und 5 ng/mm<sup>2</sup>. Werte unterhalb 1 ng/mm<sup>2</sup> führten dazu, dass zu wenig Bindungsplätze vorhanden sind, um spezifische von unspezifischen Bindungen zu unterscheiden (**Tab. 3.8**). Die Kopplung der N- oder C-terminalen Domäne erfolgte immer so, dass die Bindung mit der Membran-ständigen Seite der Extension an die Küvette erfolgte.



**Abb. 3.12** Anbindungsspektrum zweier CM-Oberflächen. Aktivierung der Oberflächen mit einer Mischung aus EDC/NHS, Anbindung der C-terminalen Domäne (C-Bet) von BetP und Vergleichszelle (anstatt C-Bet nur Puffer zugegeben). Die Massenzunahme der Oberfläche als *response unit* berechnet ( $\Delta RU$ ).

**Tab. 3.8** Anbindung untersuchter Peptide an verschiedene Oberflächen der *Resonant Mirror*-Küvetten. Umrechnung der Anbindung für AS (Aminosilan), C (Carboxylat) und Biotin lautet  $600 \text{ arcs} \cong 1 \text{ ng/mm}^2$ . Für CM (Carboxymethyldextran)  $200 \text{ arcs} \cong 1 \text{ ng/mm}^2$ . n.a. = nicht angebunden; *random 8*: Schleife 8 mit veränderter AS-Sequenz.

Oberfläche Bindeprotein	AS [arcs (ng/mm <sup>2</sup> )]	CM [arcs (ng/mm <sup>2</sup> )]	Biotin [arcs (ng/mm <sup>2</sup> )]
C-Extension	210 (0,35)	2460 (12,3)	24 (0,04)
		2098 (10,5)	30 (0,05)
N-Extension	192 (0,32)	446 (2,23)	780 (1,3)
	132 (0,22)		
Schleife 8	323 (0,54)	830 (4,15)	n.a.
<i>random 8</i>	29 (0,05)	n.a.	n.a.
BSA	195 (0,325)	n.a.	n.a.
Cytochrom C	n.a.	440 (2,2)	n.a.

Die Massenzunahmen ausgewählter Anbindungen sind in **Tab. 3.8** zusammengefasst. Dabei zeigte sich aber, dass die Anbindung der C-terminalen Domäne an die CM-Oberfläche auch die größte Menge an gebundener Extension erbrachte. Die Anbindung mit der C-terminalen Seite an eine AS-Oberfläche führt nur zu einem Zehntel der erwarteten Massenzunahme. Die N-terminale Domäne wurde entsprechend über ihren C-Terminus an Aminosilan (AS)-Oberflächen angebunden. Hier war auch die CM-Oberfläche die effektivere zur Peptidverknüpfung, obwohl dann die N-Extension in der falschen Orientierung vorlag. Die Anbindung der biotinylierten Extensionen über Streptavidin an eine Biotinoberfläche führte nur bei der N-terminalen Domäne zu ausreichend verknüpftem Peptid. Als Kontrolle wurde die Anbindung von Cytochrom C und BSA durchgeführt. Die Massenzunahme des positiv geladenen Cytochrom C an eine CM-Oberfläche führte zu  $2,2 \text{ ng/mm}^2$  und entsprach der Massenzunahme mit der negativ geladenen N-Extension an diese Oberfläche. Die Massenzunahmen durch ungeladenes BSA an eine AS-Oberfläche war ähnlich gering ( $0,325 \text{ ng/mm}^2$ ) wie die Zunahme durch die positive C-Extension ( $0,35 \text{ ng/mm}^2$ ). Unterschiedliche Ladungen der Anbindungsproteine war somit nicht entscheidend für einen Anbindungserfolg. Vielmehr musste für jedes Anbindungsprotein die geeignete Oberfläche ausgetestet werden.

### 3.6.1.2 Lipidbelegung nicht-derivatisierter Oberflächen

Durch Zugabe von Lipiden auf nicht-derivatisierte Oberflächen sollte im optimalen Fall ein *bilayer* gebildet werden. Die Lipidbelegung der Küvettenoberfläche nach Angaben des Herstellers (Protokoll 1.6) führte nicht, wie beschrieben, zu einer Massenzunahme von 600 - 1000 arcs (Bildung eines *bilayers*) nach Verdünnen des Lipidmix mit zweimal 30  $\mu$ l PBS. Erst nach weiterer Zugabe von 30  $\mu$ l PBS konnte ein Anstieg in den *response units* beobachtet werden. Falls danach immer noch keine ausreichende Massenzunahme detektiert werden konnte, wurde die Lösung in der beladenen Zelle abgesaugt und die Anbindung durch Zugabe von neuem Lipidmix wiederholt (Daten nicht gezeigt).

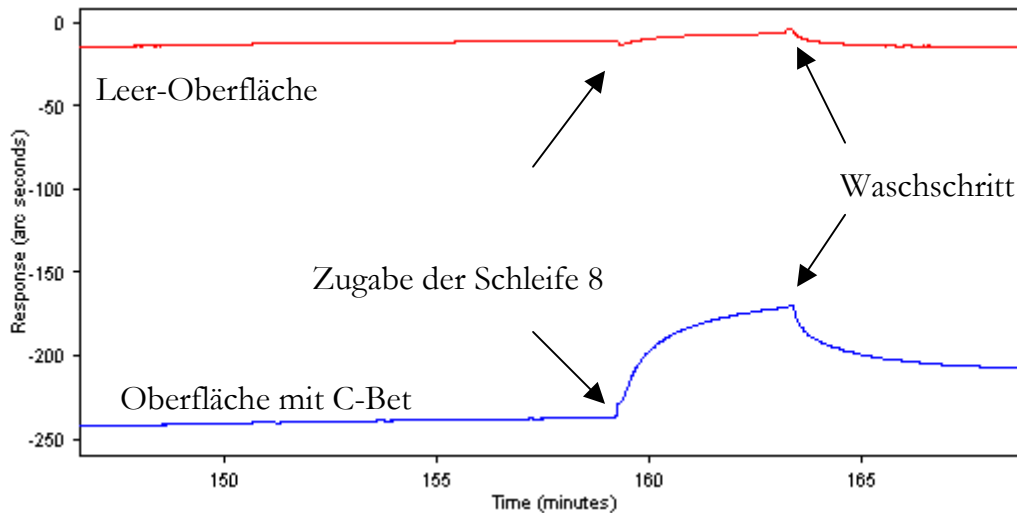
### 3.6.2 Quantifizierung von Peptid/Peptid- und Peptid/Lipid-Interaktionen

Zur Identifizierung und Quantifizierung von Peptid/Peptid-Wechselwirkungen wurden Interaktionen der C-terminalen Domäne mit der N-Extension oder einer der cytoplasmatischen Schleifen von BetP in Erwägung gezogen. Zur Untersuchung von Peptid/Lipid-Wechselwirkungen wurde die Affinität der C-Extension zu verschiedenen Lipidoberflächen gemessen. Nachdem Strukturbildung in der C-terminalen Domäne in Anwesenheit von amphiphilen Oberflächen beobachtet worden war, wurden nun Lipide gewählt, die in der Cytoplasmamembran von *E. coli* oder *C. glutamicum* zu finden sind. Damit sollte eine mögliche Interaktion unter physiologischen Bedingungen festgestellt und quantifiziert werden.

#### 3.6.2.1 Peptid/Peptid-Interaktionen

Auf der Suche nach möglichen Interaktionspartnern für die C-terminale Domäne von BetP wurde die C-Extension N-terminal an unterschiedliche Oberflächen kovalent angebunden. Anschließend wurde durch konzentrationsabhängige Zugabe chemisch synthetisierter Schleifen des Transporters BetP (*loop* 2, 4, 6, 8 und 10) die spezifische Interaktion durch Ermittlung der Dissoziationskonstanten bestimmt. Nach einem Anbindungsereignis (z. B. Schleife 8 an C-terminale Domäne; **Abb. 3.13**) wurden eventuelle unspezifische Anbindungsereignisse auf der Leeroberfläche abgezogen und die Tangentensteigung am Ursprung der Anbindungskurve berechnet (Gleichung 3.1).





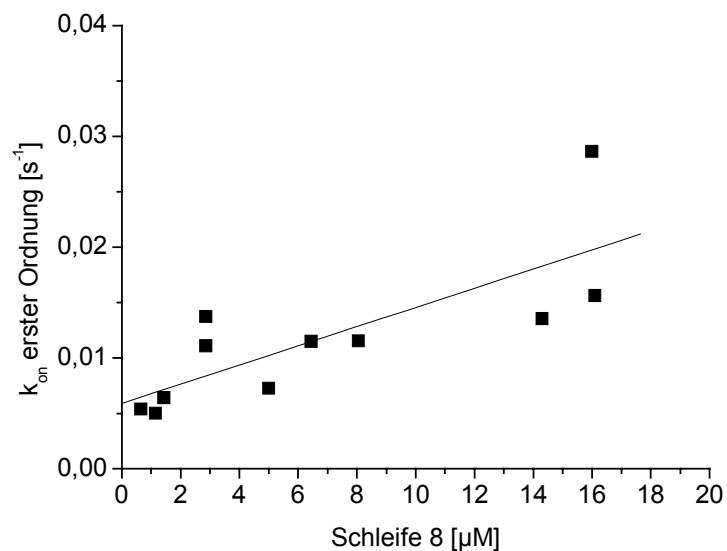
**Abb. 3.13** Anbindung der Schleife 8 (1 mg/ml) an die C-terminale Domäne (C-Bet; unten) und an die leere CM-Oberfläche (oben).

Es gilt dabei:

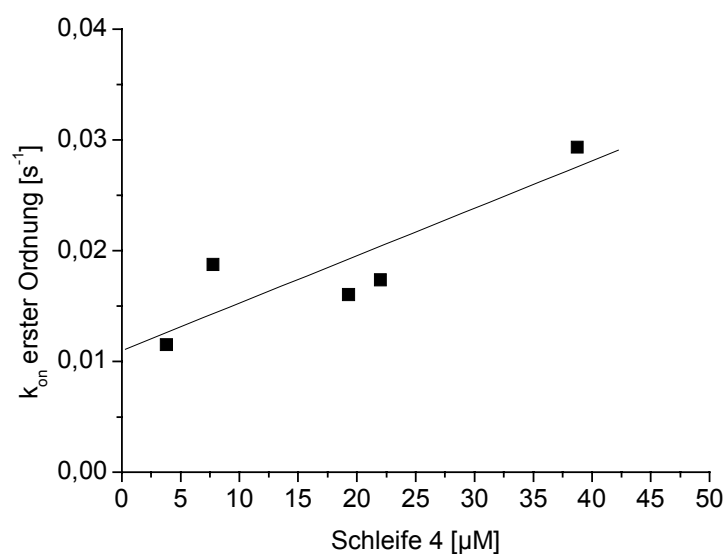
$$k_{\text{on}} = k_{\text{ass}} \times c + k_{\text{diss}} \qquad K_{\text{D}} = \frac{k_{\text{diss}}}{k_{\text{ass}}} \qquad (3.1)$$

$k_{\text{on}}$	Anbindungsrate [ $\text{s}^{-1}$ ]
$k_{\text{ass}}$	Assoziationsratenkonstante [ $\text{l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ ]
$k_{\text{diss}}$	Dissoziationsratenkonstante [ $\text{s}^{-1}$ ]
$K_{\text{D}}$	Dissoziationskonstante [M]

Der  $K_{\text{D}}$ -Wert [M] wird über die Geradengleichung der einzelnen Anbindungsraten unterschiedlicher Konzentrationen eines Anbindungspartners berechnet. Dabei zeigte sich, dass die Schleifen 6 und 10 keine Affinität zur C-terminalen Domäne besitzen. Die höchste Affinität zeigte Schleife 8 (**Abb. 3.14**), gefolgt von Schleife 4 (**Abb. 3.15**) und 2 (**Tab. 3.9**). Die Anbindungskinetiken wurden mit verschiedenen Fraktionen der C-terminalen Domäne und immer wieder erneuerten Oberflächen durchgeführt. Dabei war der Kurvenverlauf der Anbindungsraten immer gleich, allerdings abhängig von der Peptidfraktion oder von der Oberfläche im  $k_{\text{on}}$  verschoben. Dies liegt daran, dass einerseits die Proteinbestimmung der kurzen Peptide fehleranfällig ist und andererseits die Qualität der Oberfläche nur anhand von Affinitäten bestimmt werden kann.



**Abb. 3.14** Auftragung der Anbindungsraten der Schleife 8 an die C-terminale Domäne (C-Bet) an einer Carboxymethyl-dextran-Oberfläche gegen die Konzentration von Schleife 8. Die Anbindung folgt einer Reaktion 1. Ordnung.



**Abb. 3.15** Anbindung der Schleife 4 an die kovalent angebundene C-terminale Domäne (C-Bet) an eine Carboxymethyl-dextran-Oberfläche. Die Anbindung folgt einer Reaktion 1. Ordnung.

Nach Berechnung des  $K_D$ -Wertes ist die Affinität von Schleife 8 zu der C-Extension doppelt so hoch, wie die entsprechenden Affinitäten der Schleifen 2 und 4 (**Tab. 3.9**). Die Schleife 8, die eine Zufallsabfolge der Aminosäuren enthielt (*random 8*), zeigte eine

160 fach geringere Affinität zur C-Extension als Schleife 8. Damit konnte gezeigt werden, dass die Wechselwirkung zwischen der C-Extension und der Schleife 8 spezifisch ist und mit der *Resonant Mirror*-Spektroskopie gut quantifiziert werden kann. Die Anbindung der Schleife 6 und 10 war so schwach, dass die Berechnung des  $K_D$ -Wertes nicht möglich war.

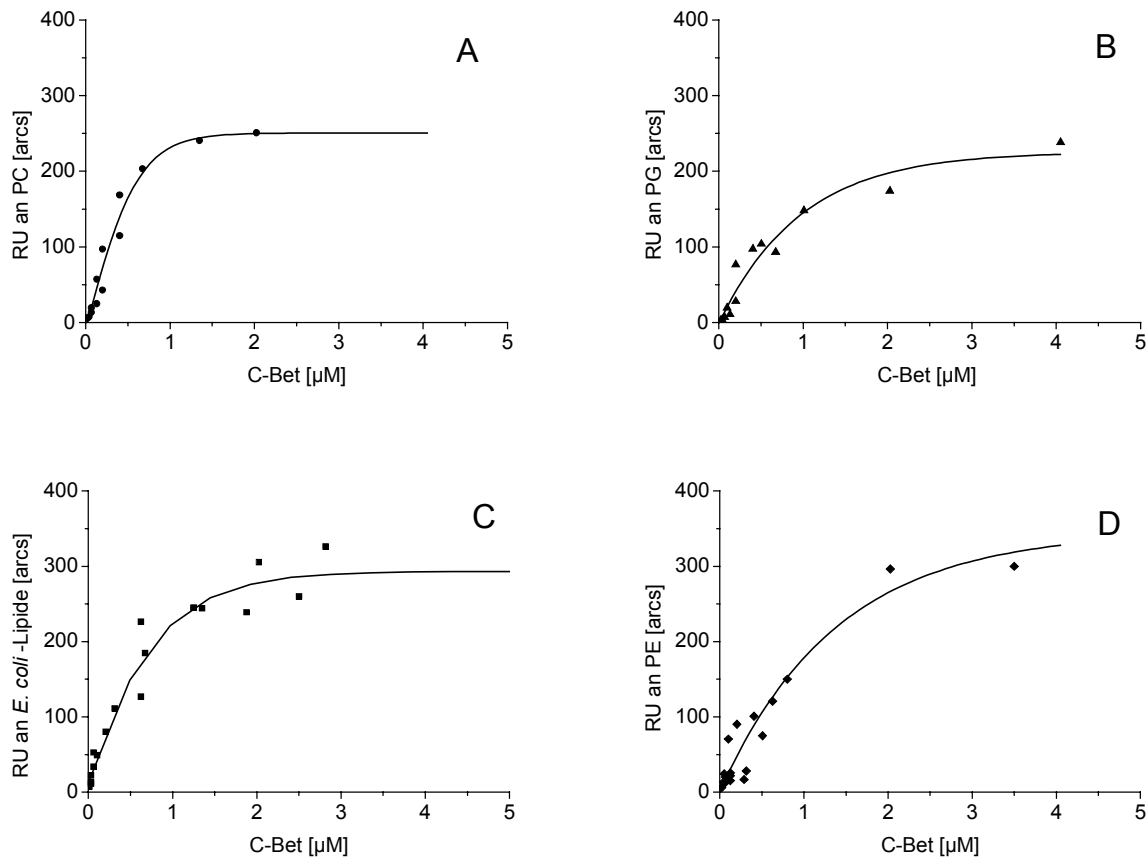
**Tab. 3.9** Quantifizierung der Interaktion verschiedener Peptide mit der angebundenen C-terminalen Domäne (N-terminal an Carboxymethyldextran). Corr. Coeff: Korrelationskoeffizient der Geradengleichung. random 8: Schleife 8 mit veränderter AS-Sequenz.  $B_{\max}$ : maximale Zahl an belegten Bindungsplätzen.

Anbindung an die C-Extension	Schleife 2	Schleife 4	Schleife 6	Schleife 8	Schleife 10	random 8
$k_{\text{ass}}$ [ $\text{M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ ]	27,1	421	<0,001	574	<0,001	4,08
$k_{\text{diss}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	0,006	0,01	4578	0,005	21	0,007
$K_D$ [ $\mu\text{M}$ ]	22	20	-	9,4	-	1600
$B_{\max}$ [M]	0,013	0,026	-	0,015	-	0,012
Corr. Coeff.	0,86	0,82	0,95	0,92	0,99	0,97

Die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen N-terminaler und C-terminaler Domäne wurde dadurch erschwert, dass die N-terminale Domäne stärker mit der Leer-Oberfläche oder mit angebundenem Ethanolamin an dieser Oberfläche interagiert als mit der angebundenen C-terminalen Domäne. Die Interaktion der C-Extension mit der angebundenen N-Extension führte ebenfalls nur zu schwachen Wechselwirkungen mit sehr großem berechneten Fehler (Daten nicht gezeigt). Eine Interaktion zwischen der N-Extension und einer der cytoplasmatischen Schleifen konnte nicht quantifiziert werden.

### 3.6.2.2 Peptid/Lipid-Interaktionen

Untersuchungen am Transporter BetP haben gezeigt, dass sich das Aktivitätsoptimum von BetP in Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung der umgebenden Membran verschiebt. So zeigt BetP die maximale Transportgeschwindigkeit bei einer Osmolalität von 600 mosmol/kg, wenn es funktionell in *E. coli*-Liposomen rekonstituiert ist oder nach heterologer Expression des *betP*-Gens in *E. coli* [Rübenhagen *et al.*, 2000]. Zur Untersuchung, ob die Extension möglicherweise eine Wechselwirkung mit Lipidoberflächen eingehen kann, die mit dem Aktivierungsmechanismus bzw. Sensormechanismus im Zusammenhang steht, wurden Protein/Lipid-Interaktionen mit Hilfe der *Resonant Mirror*-Spektroskopie durchgeführt.



**Abb. 3.16** Bindungskinetik der C-terminalen Domäne an unterschiedliche Oberflächen. Die maximale *response unit* (RU) nach Sättigung der Anbindung einer bestimmten Konzentration an C-Extension an eine Lipidoberfläche (A - D) ist gegen die Konzentration an C-Extension aufgetragen; **A**: Phosphatidylcholin (PC); **B**: Phosphatidylglycerol (PG); **C**: *E.coli*-Lipide; **D**: Phosphatidylethanolamin (PE).

Dazu wurden Lipidschichten mit unterschiedlichen Kopfgruppen, wie sie in der *E. coli*- oder *C. glutamicum*-Membran vorkommen (Hauptkomponenten der Phospholipide in *E. coli* ist Phosphatidylethanolamin (80 %) und in *C. glutamicum* Phosphatidylglycerol (70 - 80 %) [Hoischen und Krämer, 1990; Prasad, 1996], angebunden. Weiterhin wurden Oberflächen mit methyliertem Phosphatidylethanolamin (Phosphatidylcholin) hergestellt und Interaktionen der C-terminalen Domäne oder der N-terminalen Domäne daran untersucht. Die N-terminale Domäne zeigte keine auswertbare Interaktion zu fünf verschiedenen Lipidoberflächen. Für die C-terminale Domäne hingegen konnten die Affinitäten zu fünf Lipidoberflächen (Phosphatidylethanolamin, -cholin, -glycerol, *E. coli*-Lipide und einem Gemisch aus *E. coli*-Lipiden und Phosphatidylglycerol) quantifiziert werden. Dabei waren die Affinitäten zu allen Lipiden und Lipidkombinationen etwa gleich groß (vier Oberflächen dargestellt: **Abb. 3.16**). Anhand der Bindungsdaten der C-

terminalen Domäne an unterschiedliche Lipide können die Lipide in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die neutralen Lipide mit negativer Phosphorylgruppe und positiver Kopfgruppe (PE, *E. coli* und PC) zeigen geringere Affinität zur C-Extension als Phospholipide mit ungeladener Kopfgruppe (**Tab. 3.10**). Die maximale Zahl an berechneten Bindungsplätzen ( $B_{\max}$ ) liegt bei allen Oberflächen zwischen 200 und 300 mM. Nur reine *E. coli*-Lipide besitzen nach den vorliegenden Daten dreimal mehr Bindungsplätze (**Tab. 3.10**). Daten aus Liposomen und ganzen Zellen zeigen, dass das Aktivitätsoptimum von BetP mit steigendem Phosphatidylglycerolgehalt der Membran zu höheren Osmolaritäten verschoben ist [Rübenhagen, 2000]. Falls die Interaktionsstärke der C-terminalen Domäne mit der Lipidschicht mit dem Aktivierungsoptimum korreliert ist, verschiebt sich mit zunehmender Affinität der C-Extension an die Lipidschicht das Aktivierungsoptimum von BetP zu höherer Osmolarität.

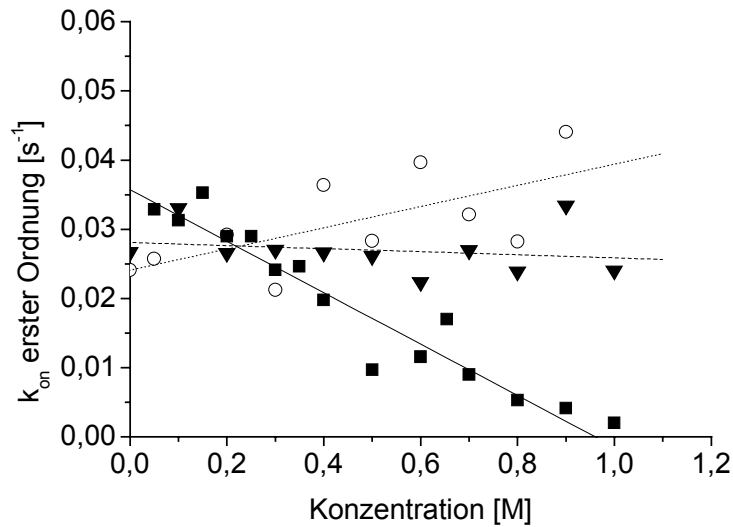
**Tab. 3.10** Anbindungsdaten der C-terminalen Domäne an verschiedene Lipid-Oberflächen. ***E. coli***: *E. coli*-Lipide; **PE**: Phosphatidylethanolamin; **PG**: Phosphatidylglycerol; **PC**: Phosphatidylcholin; **2/3PG**: Massenverhältnis 2/3 PG und 1/3 *E. coli*-Lipide;  $B_{\max}$ : maximale berechnete Zahl an Bindungsmöglichkeiten.

Anbindung an Lipide	<i>E. coli</i>	PE	PG	2/3PG	PC
$k_{\text{ass}} [\text{M}^{-1} \times \text{s}^{-1}]$	8649	19308	16850	1113	31766
$k_{\text{diss}} [\text{s}^{-1}]$	0,017	0,038	0,013	0,001	0,095
$K_{\text{D}} [\mu\text{M}]$	2	2	0,8	0,9	3
$B_{\max} [\text{M}]$	1231	382	219	215	328
Corr. Coeff.	0,89	0,97	0,93	0,92	0,99

Die Verkürzungen der C-terminalen Domäne (die chemisch synthetisierten letzten 21 Aminosäuren und ersten 35 Aminosäuren der C-Extension) interagieren unterschiedlich stark mit den Lipidoberflächen (Daten nicht gezeigt). Die Zahl der Bindungsplätze lag wie bei der vollständigen C-Extension auch für die Verkürzungen bei ca. 200 mM (Daten nicht gezeigt). Die Verkürzung C-21 zeigte ähnliche Affinitäten zu PG und PE-Oberflächen ( $K_{\text{D}} \approx 1,5 \mu\text{M}$ ), die die Hauptkomponente der *E. coli*-Lipide darstellen. Die Anbindungen waren allerdings sehr fehlerhaft und wurden nicht weiter interpretiert (Daten nicht gezeigt).

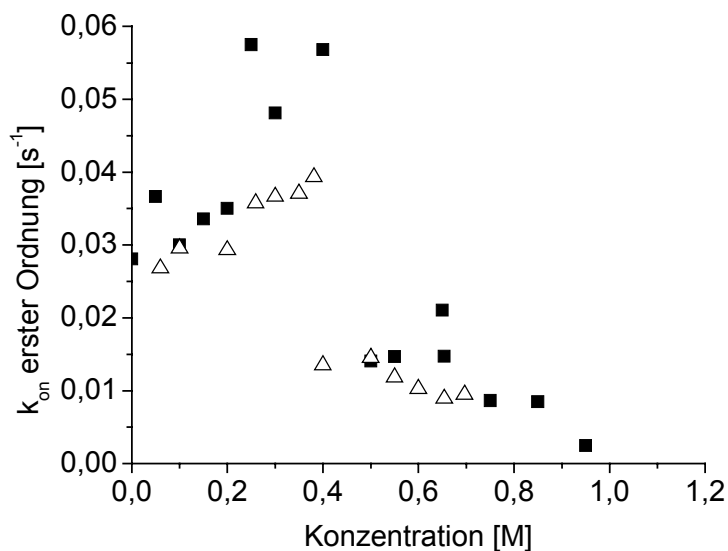
### 3.6.2.3 Abhängigkeit der Lipid anbindung in Anwesenheit verschiedener Solute

Nach einem hyperosmotischen Schock wurde in *E. coli* eine Verringerung des Zellvolumens durch den Ausstrom von cytoplasmatischem Wasser gefunden [Cayley *et al.*, 1992]. In *Halobacteriaceae* und in Gram-negativen Bakterien, wie *E. coli*, findet als erste Antwort auf einen hyperosmotischen Stress ein massiver Einstrom an  $K^+$ -Ionen statt [Galinski und Trüper, 1994; Dinnbier *et al.*, 1988]. Für *C. glutamicum* könnte dies bedeuten, dass durch eine Volumenverringerng die Konzentration interner Ionen steigt und als Signal für BetP wirkt oder andere interne Solute diese Signalfunktion übernehmen könnten. Die Wirkung von Soluten oder Ionen auf die Interaktion zwischen C-terminaler Domäne und Lipidmembran wurde mit Hilfe der *Resonant Mirror*-Spektroskopie untersucht. Dazu wurden dem PBS-Puffer unterschiedliche Konzentrationen verschiedener Ionen oder organischer Moleküle zugesetzt. Die Anbindungseigenschaften der C-terminalen Domäne an *E. coli*-Lipide veränderten sich in Anwesenheit von neutralen Verbindungen, wie Prolin und Trehalose, (bis 1 M) nicht. Ionische Verbindungen oder Ionen, wie Cholinchlorid, Glycinbetain, NaCl und Natriumglutamat, beeinflussten ebenfalls die Anbindung nicht oder verringerten die Anbindung kontinuierlich mit steigender Ionenstärke des Puffers (**Abb. 3.17**). Weitverbreitete kompatible Solute, wie Glycinbetain, Prolin, Cholin, Glutamat und Trehalose, haben somit keinen Molekül-spezifischen Einfluss auf die Interaktion zwischen der C-Extension und einer Lipidoberfläche.

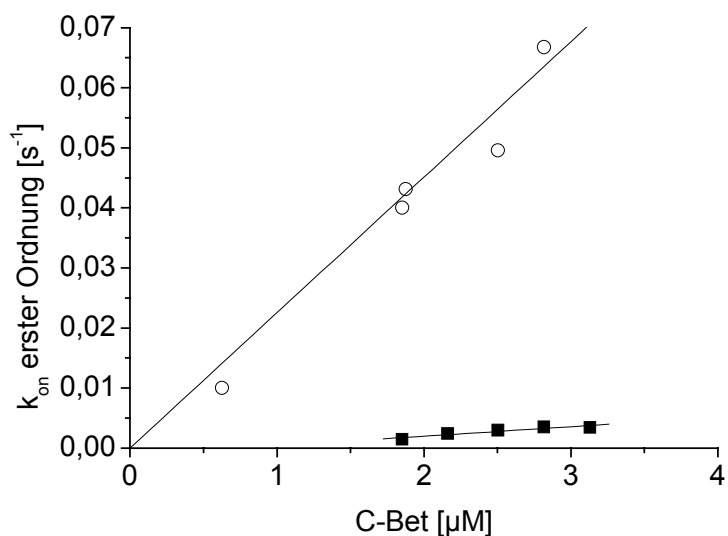


**Abb. 3.17** Anbindungsraten der C-terminalen Domäne (14  $\mu\text{M}$ ) an eine *E. coli*-Oberfläche in Anwesenheit unterschiedlicher Solute ( $\theta$  Cholinchlorid oder Prolin;  $\blacksquare$  Natriumglutamat) und Ionen ( $\circ$  NaCl).

Das Anbindungsverhalten der C-terminalen Domäne änderte sich jedoch nach Zugabe von Kalium unabhängig vom zugehörigen Anion. In einem Konzentrationsbereich von 0 bis 400 mM Kalium stieg dabei die Affinität der Extension zu der Lipidoberfläche zunächst an. Ab einer Schwellenkonzentration von 400 mM Kalium sank die Bindefähigkeit drastisch ab. Die Art des Anions spielte bei diesem Effekt keine Rolle (**Abb. 3.18**). Gleiches war zu beobachten mit Kalium-verwandten Ionen, wie Rubidium und Cäsium (Daten nicht gezeigt). Die konzentrationsabhängige Anbindung der C-terminalen Domäne an die *E. coli*-Lipide war in Anwesenheit von 0,6 M KCl eindeutig verringert (**Abb. 3.19**).



**Abb. 3.18** Anbindungsraten der C-terminalen Domäne (14  $\mu\text{M}$ ) an eine *E. coli*-Oberfläche in Anwesenheit unterschiedlicher Kaliumverbindungen (■ KCl;  $\triangle$  Kaliumglutamat).

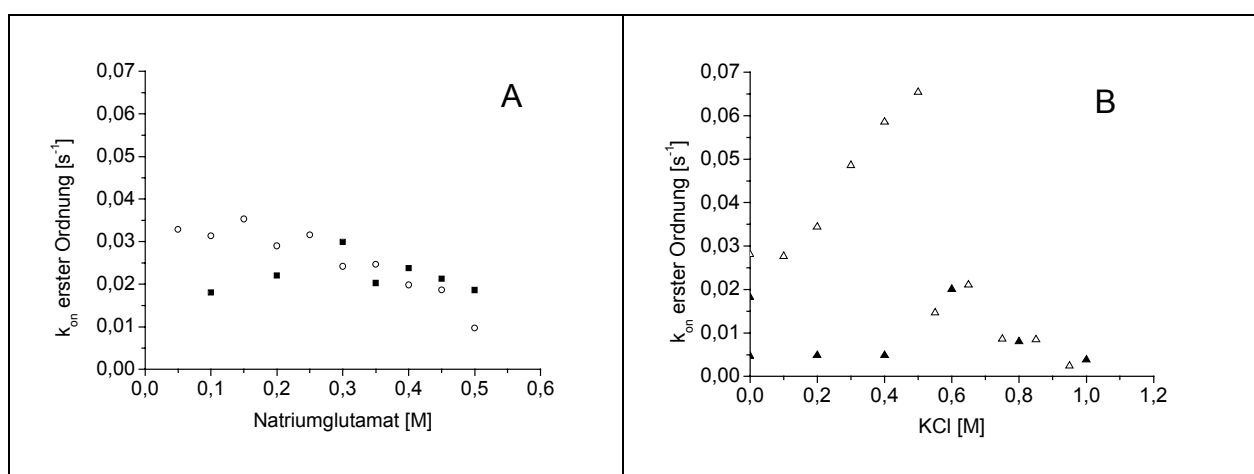


**Abb. 3.19** Anbindungsraten der C-terminalen Domäne (14  $\mu\text{M}$ ) an eine *E. coli*-Oberfläche in Anwesenheit von 0,6 M KCl (■) und ohne KCl (○) in PBS-Puffer.

Der Anstieg der Osmolarität hat keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen der C-terminalen Domäne und der Lipidschicht. Dies konnte an zwei Beispielen gezeigt werden. In einem Versuch wurde die Osmolarität mit Natriumglutamat bis auf ein 1 osmol/kg gesteigert und im Vergleich dazu die Osmolarität bei steigenden Natriumglutamatkonzentrationen mit Prolin auf 1 osmol/kg fest eingestellt (**Abb. 3.20A**).

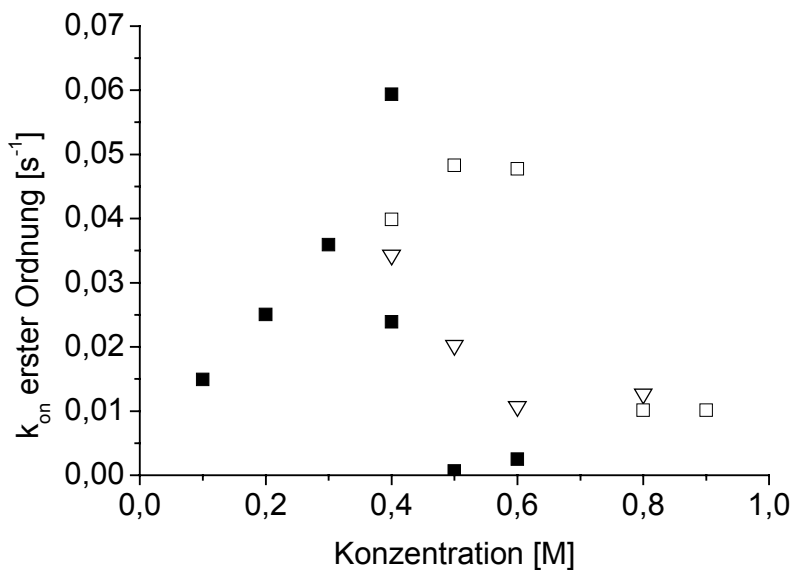


Dabei waren die Anbindungsraten bis zu 0,2 M Natriumglutamat durch hoher Osmolarität zwar geringer, als die Anbindungsraten unter niedrigeren Osmolaritäten. Allerdings ist das mit der hohen Ionenstärke zu erklären, die im hochosmolaren Medium höher ist als in niedrig osmolarem Medium. Mit zunehmender Natriumglutamatkonzentration waren die Anbindungsraten allerdings unabhängig von der Osmolarität gleich groß. Im zweiten Versuch wurde der Reaktion auf Kaliumionen bei konstanter und abhängig von der Kaliumkonzentration wechselnder Osmolarität untersucht. Die Einstellung der konstanten Osmolarität erfolgt mit NaCl auf 2 osmol/kg. Dabei konnte der Kaliumioneneffekt in beiden Fällen beobachtet werden. Auf Grund der hohen Ionenstärke waren die Anbindungsraten unterhalb von 600 mM Kaliumionen jedoch im konstant hochosmolaren Puffer sehr niedrig. (**Abb. 3.20B**). Die Osmolarität hat somit keinen Einfluss auf die Affinität der C-terminalen Domäne zur Oberfläche. Nur die Konzentration an Kaliumionen ist entscheidend.

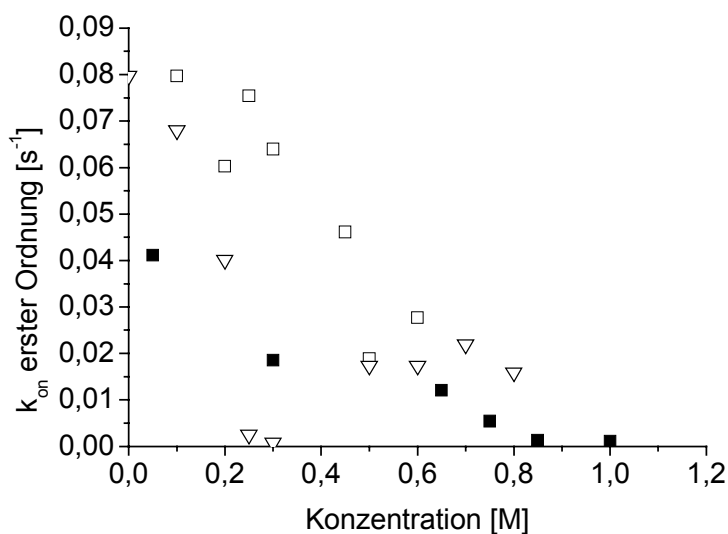


**Abb. 3.20** Anbindungsraten der C-terminalen Domäne an *E. coli*-Lipiden bei gleicher und unterschiedlicher Osmolarität. **A:** Anwesenheit von Natriumglutamat ohne Prolin (○) und isoosmolar mit Prolin auf 1 osmol/kg eingestellt (■); **B:** Anwesenheit von KCl ohne NaCl (ρ) und isoosmolar mit NaCl auf 2 osmol/kg eingestellt (π).

Andere Oberflächen, wie Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylcholin (PC) zeigten ähnliche Anbindungseffekte der C-terminalen Domäne in Anwesenheit von Kalium, Rubidium oder Cäsium (**Abb. 3.21**). Rubidium zeigte dabei einen etwas verschobenen Schwellenwert, denn erst bei 800 mM Rubidium war die Anbindung signifikant gestört. Andere Kationen (Na, Li, Ca, Mg, Cholin) zeigten diesen Effekt nicht.



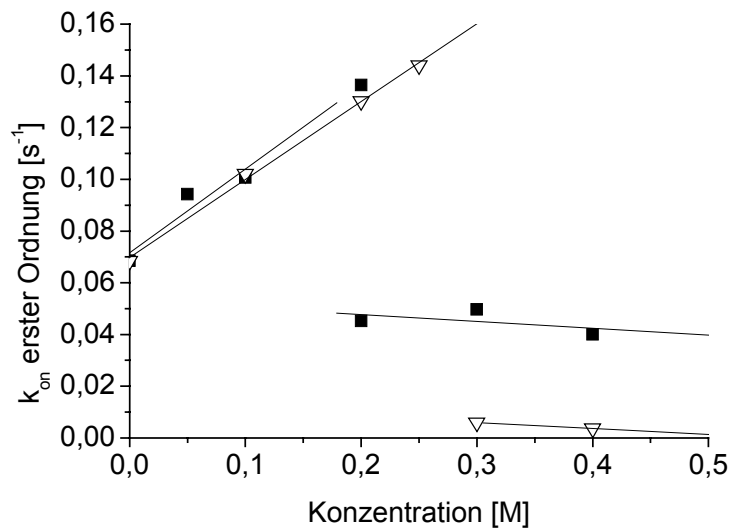
**Abb. 3.21** Anbindungsraten der C-terminalen Domäne an eine PE-Oberfläche in Anwesenheit von unterschiedlichen Kationen. □ RbCl; ■ KCl; σ CsCl.



**Abb. 3.22** Anbindungsraten der C-terminalen Domäne an eine PG-Oberfläche in Anwesenheit von unterschiedlichen Kationen. σ CsCl; ■ KCl; □ RbCl.

Die Affinität der C-terminalen Domäne zur Lipidoberfläche aus Phosphatidylglycerol (PG) war ebenfalls abhängig von den Ionen Kalium und Caesium. Allerdings konnte die Abhängigkeit zu Rubidium nicht mehr gemessen werden. Die Abnahme der Affinität war linear zur steigenden Rubidiumkonzentration und wird als allgemeiner Ioneneffekt

interpretiert. Der Effekt von KCl war ebenfalls verändert und nicht mehr so stark ausgeprägt. Dagegen war der Effekt in Anwesenheit von Cäsium sehr deutlich (**Abb. 3.22**). Ammoniumchlorid störte die Anbindung der C-terminalen Domäne wesentlich früher als Kaliumchlorid (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.23** Anbindungsraten der Verkürzung C-21 (3  $\mu$ M) der C-Extension an eine *E. coli*-Oberfläche in Anwesenheit von unterschiedlichen Kationen.  $\sigma$  NaCl;  $\blacksquare$  KCl.

Die Verkürzungen der C-terminalen Domäne zeigten sehr unterschiedliche Affinitäten zu den untersuchten Oberflächen. Die Verkürzung C-21 verlor die Affinität zur *E. coli*-Oberfläche nicht nur durch Kalium sondern auch durch Natrium (**Abb. 3.23**). Andere Ionen oder Solute konnten diese Affinitätsänderung nicht erzeugen. Mit der Verkürzung C-12 konnten diese Effekte nicht mehr beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Verkürzung C-35 hingegen änderte ihre Anbindungseigenschaften in Anwesenheit von Ionen gegenüber den Oberflächen nicht (Daten nicht gezeigt).

Die Kaliumspezifität ist hauptsächlich in den letzten Aminosäuren der C-terminalen Domäne zu finden. Diese Spezifität wird allerdings erst komplett ausgeprägt, wenn die vollständige C-terminale Domäne an Lipide anbindet. Der Kaliumeffekt ist im Gegensatz zur Verkürzung (letzten 21-Aminosäuren) zu höheren Ionenkonzentrationen (400 mM) verschoben. Die Kontrolle dieses Effekts an BetP in Liposomen aus *E. coli*-Lipiden führte bei Einstellung einer Kaliumkonzentration von 220 mM zur Aktivierung von BetP. Die Ablösung der C-terminalen Domäne von der Lipidoberfläche könnte ein Teil des Aktivierungsprozesses sein.

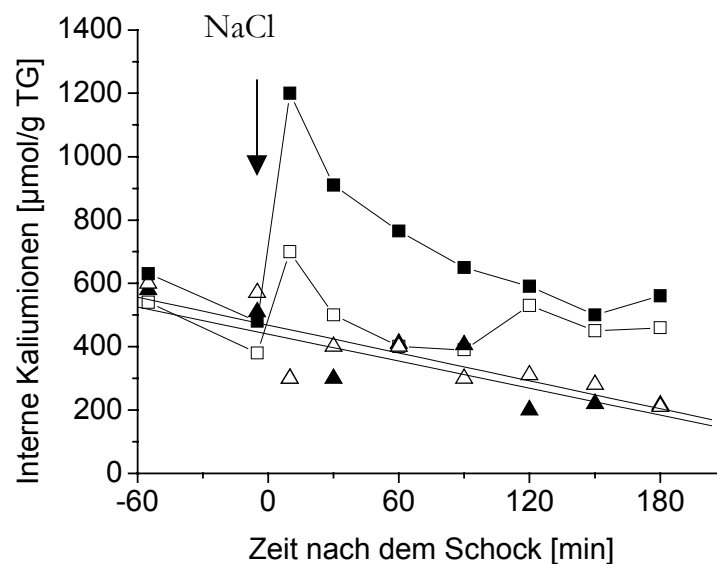
### 3.7 Physiologische Untersuchungen unter Osmostress

Die Ergebnisse über Struktur und Wechselwirkung der Extensionen von BetP wurden alle in einem künstlichen System untersucht. Sie beschreiben die Anbindung der C-terminalen Domäne an eine Lipidoberfläche und damit verknüpfte Strukturbildung. Nachdem die Kaliumkonzentration auf einen Schwellenwert ansteigt, verliert die C-terminale Domäne ihre Affinität zur Oberfläche. Rübenhagen *et al.* (2001) konnte nun eine Aktivierung von BetP in Proteoliposomen durch Steigerung der internen Kaliumionenkonzentration messen. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass der Affinitätsverlust der C-terminalen Domäne in Anwesenheit von Kaliumionen mit der Aktivierung des Transporters im Zusammenhang steht. In ganzen Zellen wurde allerdings noch keine interne Kaliumionenkonzentration nach einem hyperosmotischen Schock bestimmt. Somit konnte auch noch keine Abhängigkeit der BetP-Aktivität von der internen Kaliumionenkonzentration unter diesen physiologischen Bedingungen gemessen werden. Von *E. coli* ist das Schrumpfen der Zellen nach einem hyperosmotischen Schock beschrieben [Koch, 1984]. In *E. coli* und in *B. subtilis* wird auf einen hyperosmotischen Schock mit der Akkumulation von Kaliumionen geantwortet [Kempf und Bremer, 1998]. In *C. glutamicum* ist diese Kaliumantwort nicht bekannt und auch kein osmotisch reguliertes Kaliumaufnahme-system gefunden worden. Allerdings könnte alleine durch das Schrumpfen der Zellen die Kaliumkonzentration einen Schwellenwert überschreiten und BetP aktivieren. Aus diesen Gründen wurde das Volumen und die internen Kaliumionen von *C. glutamicum* nach einem hyperosmotischen Schock bestimmt. Dann wurde die Abfolge der akkumulierten Aminosäuren in der Zelle bestimmt und die Aktivierung von BetP im Wildtyp unter physiologischen Bedingungen nach einem Osmoschock mit dem Anstieg von Kalium und dem Zellvolumen verglichen. Dazu wurden die Zellen in zwei verschiedenen Minimalmedien angezogen (nach Inkubation in BHI) und nach einer OD um 6 mit 750 mM NaCl versetzt. Die Osmolalität des Minimalmediums MMI betrug 0,3 osmol/kg und von CGXII 0,9 osmol/kg. Der hyperosmotische Schock überführte die Zellen in MMI auf 1,8 osmol/kg und in CGXII auf 2,4 osmol/kg. Die Reaktion der Zellen bei gleicher Osmolaritätsdifferenz aber unterschiedlichen Endosmolaritäten sollte damit untersucht werden.

#### 3.7.1 Kaliumakkumulation nach einem hyperosmotischen Schock

Nachdem eine Kaliumwirkung auf die Aktivierung von BetP detektiert werden konnte [Rübenhagen *et al.*, 2001] sollte die interne Kaliumionenkonzentration *in vivo* unter plötzlichen hyperosmotischen Bedingungen untersucht werden. Zwei unterschiedliche Medien mit unterschiedlichen Osmolaritäten wurden dabei verglichen (MMI: 0,3 osmol/kg; CGXII: 0,9 osmol/kg). Beide Medien enthielten 1 mM Kaliumionen. Der

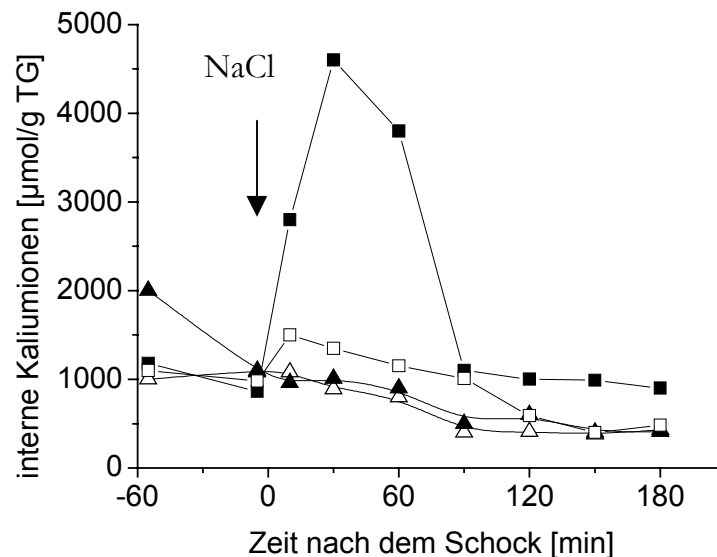
hyperosmotische Schock wurde durch Zugabe von 750 mM NaCl erzeugt. In dem niederosmolaren Medium enthielten die Wildtypzellen vor dem Schock zwischen 400 und 600  $\mu\text{mol/g TG}$  Kaliumionen (**Abb. 3.24**). Direkt nach dem Schock erhöhte sich die interne Kaliumkonzentration der gestressten Zellen in Abwesenheit von kompatiblen Soluten (hier: Glycinbetain) auf 1200  $\mu\text{mol/kg}$  und pendelte sich nach 120 min wieder auf unter 600  $\mu\text{mol/g TG}$  ein. In Anwesenheit von 2 mM Glycinbetain im Medium wurde nur kurzfristig eine Erhöhung des internen Kaliumgehaltes auf fast 700  $\mu\text{mol/g TG}$  beobachtet. Die ungeschockten Zellen verringerten ihren Kaliumgehalt in der exponentiellen Phase zunehmend auf bis zu 200  $\mu\text{mol/g TG}$  (180 min-Wert, 4. Stunde der exponentiellen Phase, Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.24** Untersuchung der internen Kaliumkonzentration in *C. glutamicum* (WT) nach einem hyperosmotischen Schock (750 mM NaCl) in Minimalmedium (MMI; 0,3 osmol/kg). Vergleich der Kaliumkonzentration in Anwesenheit von 2 mM Glycinbetain. Der Zeitpunkt des Schocks ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. ρ Wildtyp ungeschockt mit Glycinbetain; π Wildtyp ungeschockt; ■ Wildtyp geschockt; □ Wildtyp geschockt mit Glycinbetain.

Im Gegensatz zum niedrigosmolaren Medium (MMI) lag die interne Kaliummenge im höherosmolaren Medium (CGXII) schon vor dem Schock in den Wildtypzellen zwischen 900 und 1000  $\mu\text{mol/g TG}$  (**Abb. 3.25**). Nach dem Schock wurden innerhalb von 30 min im Wildtyp über 4000  $\mu\text{mol/g TG}$   $\text{K}^+$  akkumuliert. Nach 90 min waren allerdings nur noch 1200  $\mu\text{mol/g TG}$   $\text{K}^+$  intern vorhanden. Die Anwesenheit von Glycinbetain im Medium führte dazu, dass der Wildtyp nur kurzfristig 1600  $\mu\text{mol/g TG}$  Kaliumionen

anhäufte und nach 60 min wieder auf 1000  $\mu\text{mol/g TG}$  angepasst war. Auch in diesem Medium sank der interne Kaliumgehalt während des Wachstums linear ab. In der dritten Stunde der exponentiellen Phase enthielten die Kontrollen nur noch 500  $\mu\text{mol/g TG}$  internes  $\text{K}^+$  und blieben auf diesen Wert eingestellt (**Abb. 3.25**).



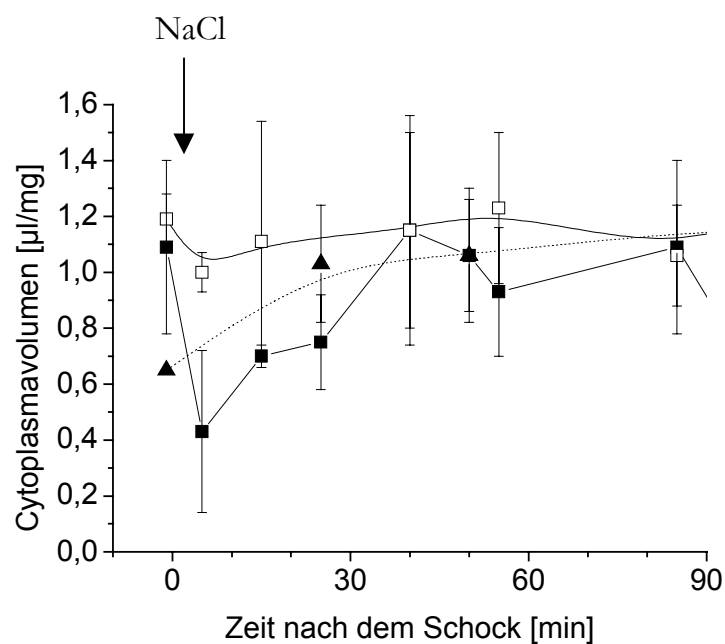
**Abb. 3.25** Untersuchung der internen Kaliumkonzentration in *C. glutamicum* (WT) nach einem hyperosmotischen Schock (750 mM NaCl) in Minimalmedium (CGXII; 0,9 osmol/kg). Vergleich der Kaliumkonzentration in Anwesenheit von 2 mM Glycinbetain. Der Zeitpunkt des Schocks ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.  $\rho$  Wildtyp ungeschockt mit Glycinbetain;  $\pi$  Wildtyp ungeschockt;  $\blacksquare$  Wildtyp geschockt;  $\square$  Wildtyp geschockt mit Glycinbetain.

Der interne Kaliumgehalt stieg unabhängig von der Ausgangsmolarität direkt nach einem hyperosmotischen Sprung von 1,5 osmol/kg an, erreichte dabei verschiedene Spitzenwerte in Abhängigkeit von der erreichten Endosmolarität im Medium und fiel nach 90 bis 120 min wieder auf den Ausgangswert zurück. Der schnelle Transport von Glycinbetain in die Zelle unter anderem durch BetP führt dazu, dass der Kaliumgehalt in den geschockten Zellen nur noch geringfügig anstieg und schneller zurückreguliert wurde. Wie in *E. coli* wird der Kaliumantwort in Anwesenheit von Glycinbetain herunterreguliert [Record *et al.*, 1998b]. Diese Ergebnisse zeigen somit eine Akkumulation an Kaliumionen in *C. glutamicum* als Antwort auf einen hyperosmotischen Schock, wie auch in *B. subtilis* und *E. coli* beschrieben. Weiterhin wurde eine mögliche Veränderung des Zellvolumens nicht berücksichtigt. Somit müssen aktiv Kaliumionen aufgenommen worden sein. Damit wird ein osmotisch reguliertes Kaliumaufnahme-system vorhergesagt. Inwieweit sich

zusätzlich das Volumen verändert und damit die interne Kaliumkonzentration verändert wird, wurde ebenfalls untersucht.

### 3.7.2 Volumenbestimmung des Wildtyps *C. glutamicum*

Der ermittelte interne Kaliumionengehalt pro Zelle entspricht nur dann den wirklichen Konzentrationen im Cytoplasma, wenn die Zellen ihr Volumen nach einem hyperosmotischen Schock beibehalten. Die Volumenuntersuchung von *C. glutamicum* wurde direkt nach einem hyperosmotischen Schock mit 750 mM in Minimalmedium (MMI; 0,3 osmol/kg) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die geschockten Zellen zu Beginn der exponentiellen Phase nach einem hyperosmotischen Schock innerhalb von fünf Minuten das Cytoplasmavolumen von 1,1 auf 0,4  $\mu\text{l}/\text{mg}$  TG verringerten (Abb. 3.26). Das interne Volumen pendelte sich nach 40 min langsam wieder auf den ursprünglichen Wert ein.

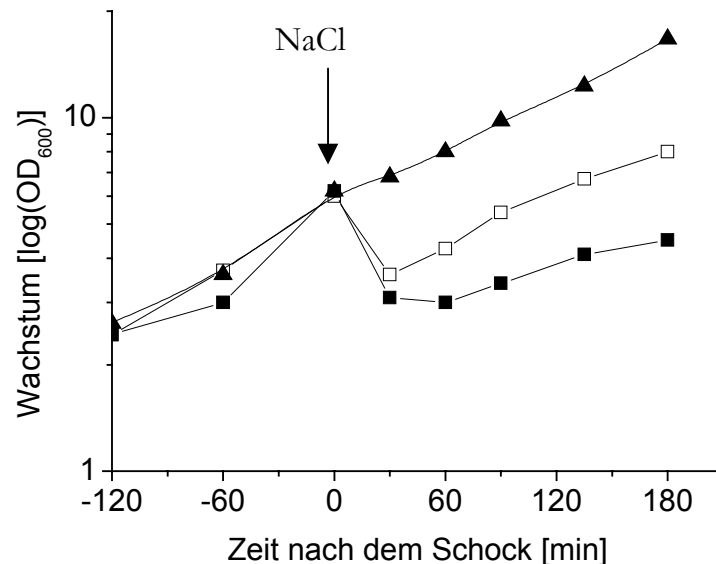


**Abb. 3.26** Zellvolumenbestimmung von *C. glutamicum* (WT) in MMI-Minimalmedium (0,3 osmol/kg) nach einem hyperosmotischen Schock (1,8 osmol/kg). Der Zeitpunkt des Schocks ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.  $\pi$  Wildtyp ungeschockt;  $\blacksquare$  Wildtyp geschockt;  $\square$  Wildtyp geschockt mit 2 mM Glycinbetain.

Bei Anwesenheit von Glycinbetain im Medium fiel das Cytoplasmavolumen direkt nach dem Schock ebenfalls ab, veränderte sich aber dabei nur von 1,2 auf 1,0  $\mu\text{l}/\text{mg}$  TG und erholte sich nach zehn Minuten wieder auf 1,1  $\mu\text{l}/\text{mg}$  TG. Im Lauf des Wachstums war ebenfalls festzustellen, dass das interne Volumen zu Beginn der exponentiellen Phase von

0,6  $\mu\text{l}/\text{mg}$  TG auf 1,0  $\mu\text{l}/\text{mg}$  TG zunahm. Es ist bekannt, dass in *C. glutamicum* das größte interne Volumen in der exponentiellen Phase gemessen wird [Rönsch, 2000]. Durch die starke Volumenverringerung könnte somit ohne aktiven Transport schon eine Steigerung der Kaliumkonzentration festgestellt werden. Bei Berücksichtigung der Volumenveränderung wurden innerhalb von 10 min nach einem Schock 3 M Kaliumionen in der Zelle gemessen. Nach 30 min sind noch 1286 mM Kaliumionen gemessen worden. Ohne Schock lag die Kaliumionenkonzentration bei 417 mM.

Die Wachstumskurven in MMI-Medium zeigen eindeutig, dass 60 min nach einem hyperosmotischen Schock das Wachstum wieder einsetzt (**Abb. 3.27**). In Anwesenheit von Glycinbetain im Medium setzt das Wachstum schon nach 30 min wieder ein. Das Wachstum setzt somit erst wieder ein, nachdem sich das Volumen wieder regeneriert hat.



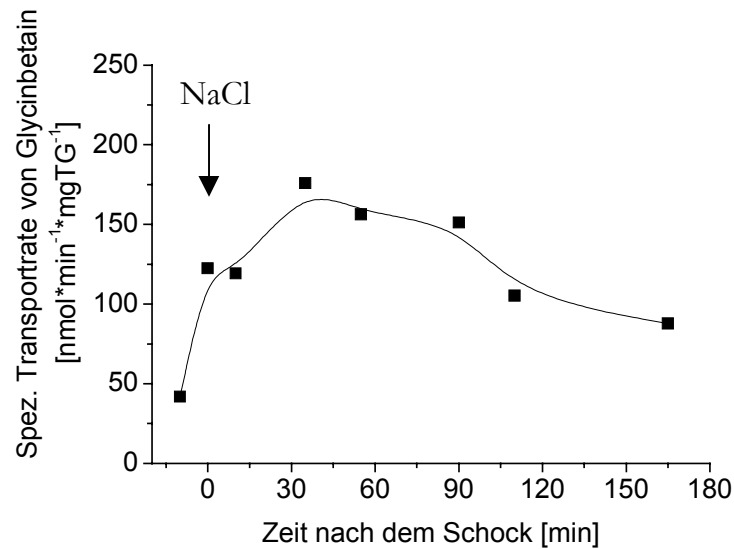
**Abb. 3.27** Veränderung des Wachstums von *C. glutamicum* in Minimalmedium MMI (0,3 osmol/kg) nach einem hyperosmotischen NaCl-Schock (1,8 osmol/kg). Der Zeitpunkt des Schocks ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.  $\blacktriangle$  Wildtyp ungeschockt;  $\blacksquare$  Wildtyp geschockt;  $\square$  Wildtyp geschockt mit GB.

### 3.7.3 BetP-Aktivität im Wildtyp nach einem Osmoschock

Untersuchungen an BetP in Proteoliposomen haben ergeben, daß der Transporter durch den Anstieg interner Kaliumionen aktiviert wird. Der in ganzen Zellen gemessene Anstieg der internen Kaliumionen nach einem Schock sollte nun ebenfalls BetP aktivieren. Bisher wurde die Aktivität von BetP in *C. glutamicum* unter physiologischen Bedingungen nicht



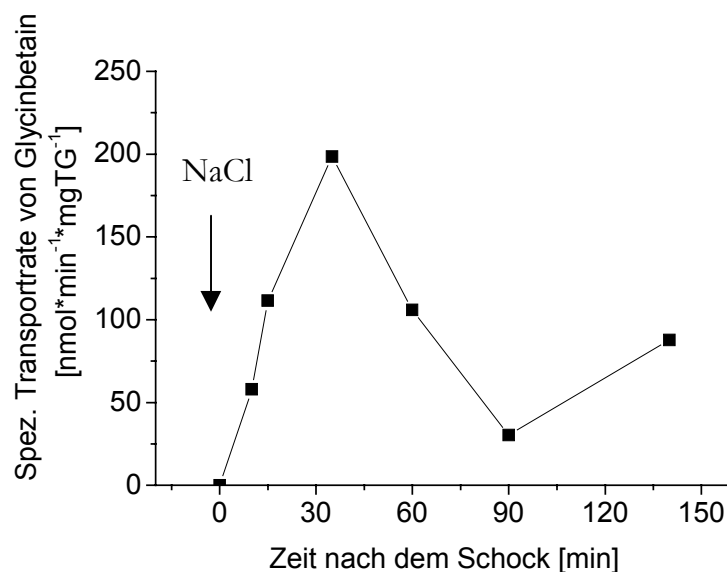
gemessen. Um exakte physiologische Bedingungen einzustellen, wurden die Zellen direkt aus dem Medium entnommen und nur mit dem gleichen Medium entsprechend verdünnt. Alle Messungen wurden zweimal wiederholt.



**Abb. 3.28** Aktivitätsuntersuchungen von BetP im Wildtyp (WT) in Minimalmedium (MMI; 0,3 osmol/kg) nach Zugabe von 750 mM NaCl (Endosmolalität 1,4 osmol/kg). Der Zeitpunkt des Schocks ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Nach einem hyperosmotischen Schock von 0,3 osmol/kg auf 1,8 osmol/kg stieg die spezifische Transportrate von BetP für Glycinbetain innerhalb von Minuten von  $40 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg TG}^{-1}$  auf  $125 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg TG}^{-1}$ . Die Aktivität erreichte ihr Maximum nach 40 min mit  $175 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg TG}^{-1}$  und fiel anschließend langsam wieder ab (**Abb. 3.28**). Inwieweit die Transportrate von Glycinbetain von neusynthetisiertem BetP abhing, wurde durch Zugabe von  $25 \mu\text{g/l}$  Chloramphenicol untersucht. Chloramphenicol inhibierte die Translation und damit die Neusynthese von BetP. Die Transportrate blieb jedoch nach einem Osmoschock auch bis nach 180 min unverändert hoch (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurde der Einfluss der anderen osmoregulierten Glycinbetain-Transporter auf die Aufnahmerate von Glycinbetain untersucht. Dazu wurde den Ansätzen jeweils 10 mM Ectoin oder Prolin im Medium zugesetzt. Ectoin wird von EctP und LcoP aufgenommen und somit der Transport von Glycinbetain durch diese Transporter kompetitiert. Die Aufnahmekinetik von Glycinbetain änderte sich dadurch aber ebenfalls nicht. Prolin wird von ProP aufgenommen und konnte auch nicht die Glycinbetainaufnahme durch BetP beeinflussen (Daten nicht gezeigt).

Nach einem hyperosmotischen Schock wurde die spezifische Transportrate von BetP im Wildtyp anschließend in hochosmolaren Minimalmedium (Endosmolalität 2,4 osmol/kg) untersucht. Dabei zeigte sich wie in MMI-Medium eine Aktivierung von BetP direkt nach Zugabe von 750 mM NaCl, die nach 40 min ein Maximum von  $200 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg TG}^{-1}$  erreichte (**Abb. 3.29**). Vor dem Schock war BetP inaktiv, in Zellen mit niedrigosmolarem Medium lag die spezifische Transportrate allerdings bei  $40 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg TG}^{-1}$ . Die Aktivität von BetP vor dem gesetzten Schock ist nicht mit der internen Kaliumionenkonzentration zu erklären, da die Kaliumionenkonzentration im hochosmolaren Medium höher war, als in dem niedrigosmolaren Medium.



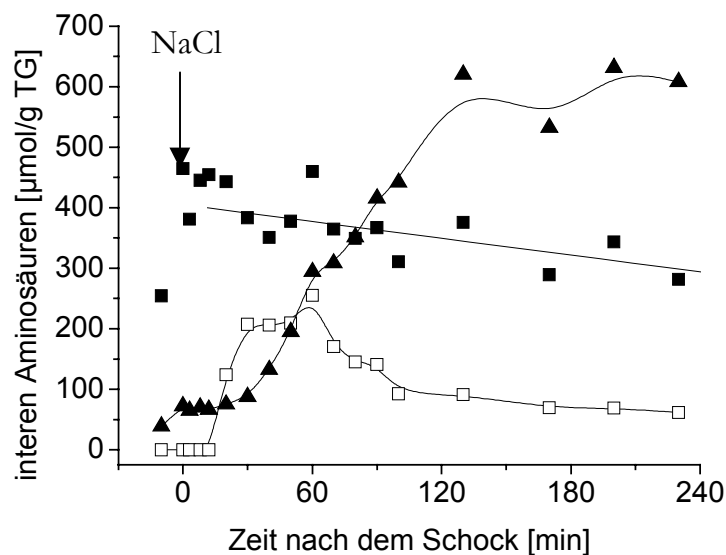
**Abb. 3.29** Aktivitätsuntersuchungen von BetP im Wildtyp-Stamm *C. glutamicum* in Minimalmedium (CGXII; 0,9 osmol/kg) nach Zugabe von 750 mM NaCl (Endosmolalität 2,4 osmol/kg). Der Zeitpunkt des Schocks ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Die BetP-Aktivität steigt direkt nach einem hyperosmotischen Schock, ist allerdings nicht abhängig von der Endosmolarität. Die Aktivierung von BetP, die im Proteoliposomen-System durch Kalium erfolgt [Rübenhagen *et al.*, 2001] kann somit auch *in vivo* durch den Anstieg der internen Kaliumkonzentration erklärt werden. Die Aktivität von BetP sinkt auch geringfügig nachdem die interne Kaliumkonzentration nach einem Schock wieder abfällt. Die direkte Abhängigkeit der BetP-Aktivität zur internen Kaliumkonzentration muss allerdings durch Anzucht von *C. glutamicum* in Medien verschiedener Osmolarität untersucht werden. Neben der internen Kaliumkonzentration und der

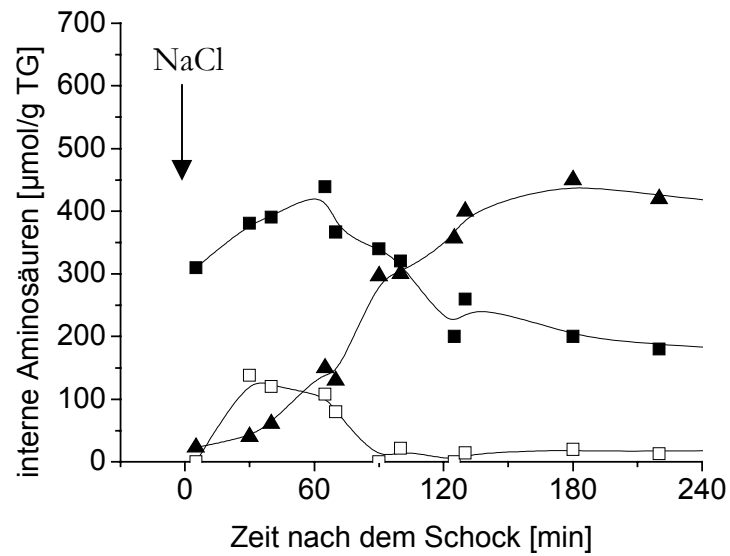
Volumenbestimmung wurde anschließend nach dem Gegenion für Kalium in Form einer Aminosäure gesucht. Dazu wurden die internen Aminosäuren bestimmt.

### 3.7.4 Aminosäureakkumulation nach einem Osmoschock

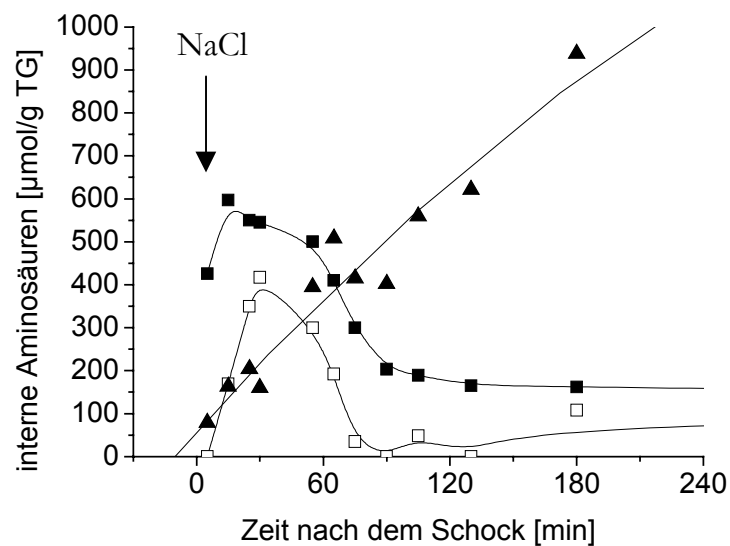
Die internen Aminosäuren wurden direkt nach der Zugabe von NaCl ins Medium gemessen. In Minimalmedium MMI wurde als erste Schockantwort die Glutamatsynthese von 250  $\mu\text{mol/g TG}$  vor dem Schock auf bis zu 500  $\mu\text{mol/g TG}$  Glutamat innerhalb von Minuten verdoppelt (**Abb. 3.30**). Nach ungefähr 20 min stieg der interne Glutaminpool von 0 auf 200  $\mu\text{mol/g TG}$ , sank dann nach 60 min wieder etwas ab. Prolin war erst nach 30 min signifikant erhöht und erreichte nach linearem Anstieg 120 min später die Höchstwerte von 600  $\mu\text{mol/g TG}$ . Bei Anwesenheit von Glycinbetain sanken der Glutamat- und Glutaminspiegel etwas schneller. Der Prolingehalt stieg langsamer und erreichte nach 120 min nur 400  $\mu\text{mol/g TG}$  (**Abb. 3.31**).



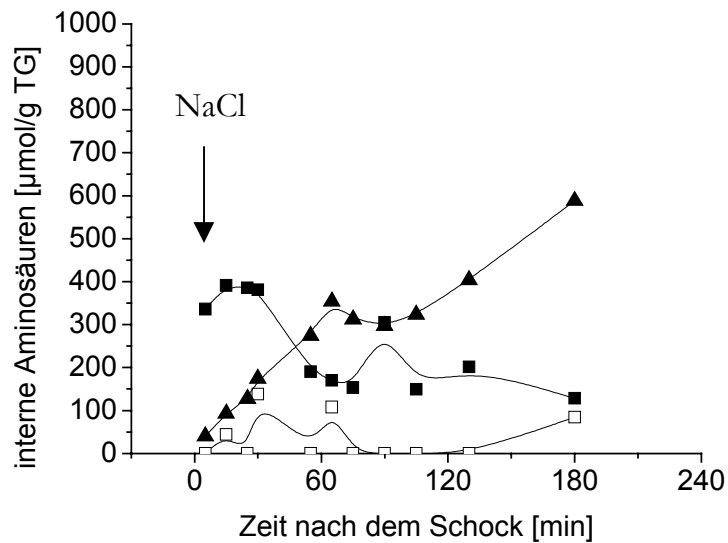
**Abb. 3.30** Synthese interner Aminosäuren bei *C. glutamicum* in Minimalmedium MMI (0,4 osmol/kg) nach einem hyperosmotischen Schock (1,4 osmol/kg). Der Zeitpunkt des Schocks ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. ■ Glutamat; □ Glutamin; ▲ Prolin.



**Abb. 3.31** Synthese interner Aminosäuren bei *C. glutamicum* in Minimalmedium MMI (0,4 osmol/kg) nach einem hyperosmotischen Schock (1,4 osmol/kg) in Anwesenheit von 2 mM Glycinbetain im Medium. Der Zeitpunkt des Schocks ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. ■ Glutamat; □ Glutamin; π Prolin.



**Abb. 3.32** Synthese interner Aminosäuren in *C. glutamicum* in Minimalmedium CGXII nach einem hyperosmotischen Schock (2,4 osmol/kg). Der Zeitpunkt des Schocks ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. ■ Glutamat; □ Glutamin; π Prolin.



**Abb. 3.33** Synthese interner Aminosäuren in *C. glutamicum* in Minimalmedium CGXII nach einem hyperosmotischen Schock (2,4 osmol/kg) in Anwesenheit von 2 mM Glycinbetain im Medium. Der Zeitpunkt des Schocks ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. ■ Glutamat; □ Glutamin; π Prolin.

In dem höherosmolaren Minimalmedium (CGXII) wurde nach Zugabe von 750 mM NaCl eine Osmolalität von 2,4 osmol/kg erreicht. Dabei erfolgte ebenfalls als erste Schockantwort eine Akkumulation von bis zu 600 µmol/g TG Glutamat (**Abb. 3.32**). Die Konzentration von Glutamin erreichte zeitverzögert nach 30 min ihr Maximum bei 400 µmol/g TG und sank anschließend wieder bis auf unter 100 µmol/g TG ab. Der Prolinspiegel stieg nach 180 min linear bis auf fast 1000 µmol/g TG an.

In Anwesenheit von 2 mM Glycinbetain im Medium wurden 30 % weniger Glutamat synthetisiert (400 µmol/g TG; **Abb. 3.33**). Nach 90 min sank der Glutamat Spiegel allerdings auf die gleiche Konzentration (200 µmol/g TG) wie ohne Glycinbetain. Der Glutaminpool erreichte keine 200 µmol/g TG mehr. Vor allem stieg auch hier die Prolinsynthese nur noch auf 600 µmol/g TG nach 180 min an.

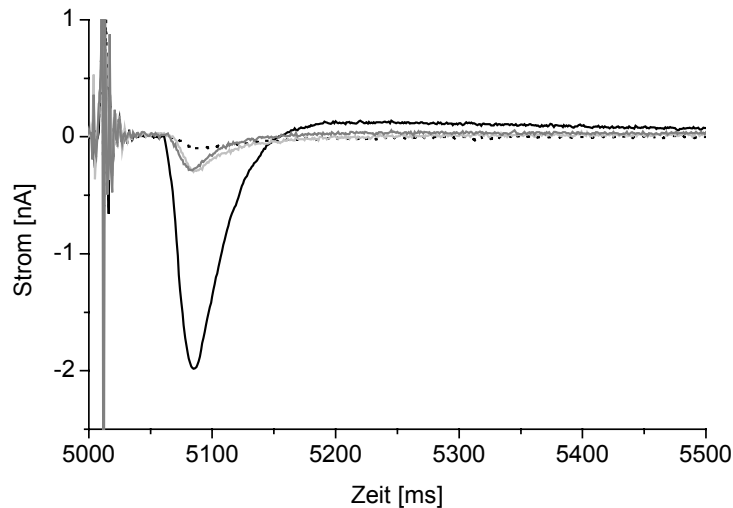
Im Gegensatz zu früheren Daten [Guillouet und Engasser, 1995] wurde in *C. glutamicum* als Gram-positivem Eubakterium eine Glutamatantwort wie in dem Gram-negativen *E. coli* beobachtet. Einige Gram-positive Bakterien (*B. subtilis*, *Lactobacillus plantarum* und andere Milchsäurebakterien) sind allerdings für einige Aminosäuren auxotroph und nehmen Prolin, Glycinbetain und Carnitin auf [Poolman und Glaasker, 1998]. Nach Einbeziehung der Volumenergebnisse verfünffachte sich die Glutamatkonzentration von 208 mM vor dem Schock auf 1125 mM 10 min nach dem Schock. Nach 30 min wurden noch 571 mM Glutamat in der Zelle gemessen. Damit entspricht die

Glutamatkonzentration in *C. glutamicum* entspricht nach 10 min 37,5 % und nach 30 min 44 % der aufgenommenen Kaliumionenkonzentration. In *E. coli* werden im Vergleich zur Kaliumionenakkumulation 25 - 50 % Glutamat in der Zelle angehäuft [Richey *et al.*, 1987; Dinnbier *et al.*, 1988]. Glutamat ist somit in der Lage die Ladung von Kaliumionen wie in *E. coli* zu kompensieren.

Die vorliegenden Daten beschreiben eindeutig eine Kaliumantwort in *C. glutamicum* nach einem hyperosmotischen Schock. Als Gegenion wird Glutamat synthetisiert. Als langfristige Antwort ersetzt synthetisiertes Prolin die kompatiblen Solute Kalium, Glutamat und Glutamin. In Anwesenheit von Glycinbetain wird allerdings die Kaliumaufnahme und die Glutamatsynthese drastisch verringert. Wie schnell BetP aktivierbar sein kann, wurde mit Hilfe der festkörperunterstützten Membranen untersucht.

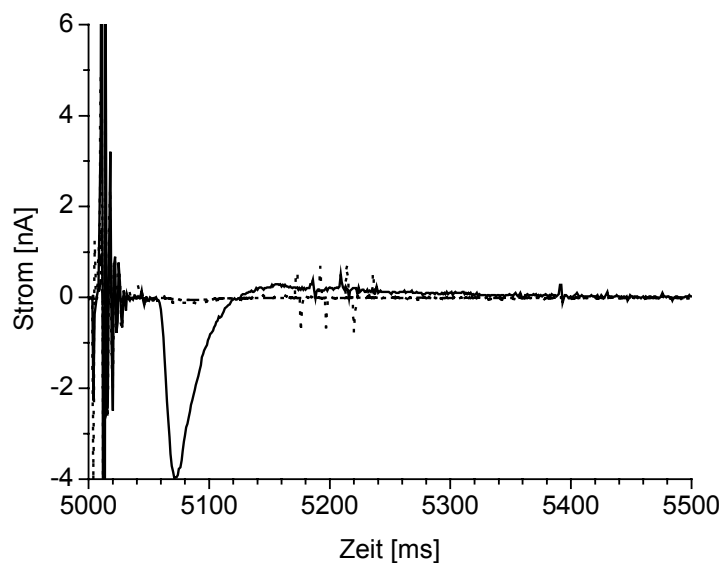
### 3.8 Aktivierung von BetP an festkörperunterstützten Membranen

Mit Hilfe der festkörperunterstützten Membranen sollte die Aktivierungszeit von BetP unter hyperosmotischen Bedingungen untersucht werden. Mit dieser Methode können Ladungsströme über einer Membran in einem geschlossenen Stromkreis zeitlich aufgelöst werden. Dazu wird BetP in Liposomen rekonstituiert und diese anschließend an eine festkörpergestützte Membranoberfläche adsorbiert. Durch den Cotransport von zwei Natriumionen nach einem Schock in die Proteoliposomen kann sich ein die ganze festkörpergestützte Membranoberfläche, eingespannt in den Stromkreis, mit Elektronen aufladen und wirkt wie ein Kondensator. Die Ladungsverschiebung der Natriumionen wird somit am Oszillographen als Kondensatoraufladung sichtbar. Nach Chemisorption der Proteoliposomen an die planar aufgezoogene Lipiddoppelschicht wurde die Reaktionskammer mit 100 mM Tris/Mes-Puffer (pH 7,5) + 250 mM NaCl gespült. Dadurch war für BetP ein hyperosmotischer Schock angelegt. Das elektrochemische Potenzial wurde mit Kaliumionen durch Zugabe von Valinomycin (10 nM im Puffer) eingestellt. Nach Zugabe von 15  $\mu$ M Glycinbetain im gleichen Puffer wurde innerhalb von 70 ms ein starker Stromabfall am Oszillographen (-2 nA) beobachtet (**Abb. 3.34**).



**Abb. 3.34** Aktivierungskurve von BetP eingebunden in ein Kondensatorsystem mit festkörperunterstützten Membranen. Kondensatoraufladung nach Zugabe von Glycinbetain im hyperosmotischen Puffer (schwarz). Anschließend erfolgten unterschiedlich lange Regenerationsphasen mit  $\text{KP}_i$  (100 mM  $\text{KP}_i$ -Puffer, pH 7,5) vor dem Neustart (punktiert: zweite Aktivierung direkt nach der ersten; grau: Aktivierung nach 40 min und 1 h).

Dieser erfolgte durch positive Aufladung des Kondensators mit Lipidschicht. Diese Aufladung war auf den Transport von Natriumionen durch BetP in die Liposomen zurückzuführen. Durch die Zunahme der positiven Ladung konnte sich der Kondensator nach 70 ms mit Elektronen laden, bis die Kapazitätsgrenze erreicht war. Nach unterschiedlichen Regenerationszeiten des Liposomensystems durch Spülen mit 100 mM  $\text{KP}_i$ -Puffer (pH 7,5) konnte der gleiche Ausschlag erst wieder nach 24 h erreicht werden (**Abb. 3.34**). Dies war nur damit zu erklären, dass die Liposomen sehr dicht sind und dass interne Natriumionen und Glycinbetain nicht in der Gleichgewichtseinstellung des Transports durch BetP im Ruhezustand wieder heraus transportiert werden. Auch die Umpolung des elektrochemischen Potentials durch Zugabe von hyperosmolarem Medium mit nur 60 mM Kalium und ohne Natrium, sowie Glycinbetain, führten nicht zur Aktivierung von BetP und dem Rücktransport der Substrate. Ein schnelleres Entleeren der Proteoliposomen konnte nicht beobachtet werden.



**Abb. 3.35** Sorbitol-Sprung. Aktivierungskurve von BetP eingebunden in ein Kondensatorsystem mit festkörperunterstützten Membranen. Kondensatoraufladung nach hyperosmotischem Stress mit 500 mM Sorbitol nach Äquilibration in 100 mM Tris/Mes-Puffer mit 15  $\mu$ M Glycinbetain (durchgezogene Linie) oder Glycin (punktierte Linie). Eine erneute Aktivierung mit Glycinbetain direkt nach dem ersten Sprung war nicht möglich (gestrichelte Linie).

Die Untersuchung der Aktivierung von BetP durch nichtionischen Osmostress (Sorbitolzugabe) führte nach Vorinkubation mit den Substraten Glycinbetain und Natrium zu der gleichen Kondensatoraufladung nach 70 ms (**Abb. 3.35**). Der Transportvorgang war durch Zugabe von Sorbitol nach Vorinkubation mit Glycinbetain genauso schnell wie durch Zugabe von Glycinbetain nach Vorinkubation mit Natriumchlorid. Die Aktivierung von BetP ist somit gleich schnell, ob in hyperosmotischen Bedingungen vorinkubiert ist und danach Substrat gebunden wird oder vorher Substrat gebunden ist und BetP mit dem Osmostress aktiviert wird.



## 4. DISKUSSION

Von den bekannten osmoregulierten Transportern in Pro- und Eukaryoten sind bislang nur drei Transportproteine (ProP aus *E. coli*, BetP aus *C. glutamicum* und OpuA aus *L. lactis*) beschrieben, deren osmosensorische Funktion innerhalb der Proteinstruktur zu finden sein muss [Racher *et al.*, 1999; Rübenhagen *et al.*, 2000; van der Heide und Poolman, 2000]. Alle drei Transporter zeigen im rekonstituierten System wie in Zellen eine Aktivierung nach einem hyperosmotischen Schock. Der molekulare Hintergrund und das eigentliche Sensorsignal waren zu Beginn der Arbeit allerdings noch in keinem Osmosensor bekannt [Wood, 1999]. Einer der drei Transporter, BetP aus *C. glutamicum*, nimmt hyperosmotische Bedingungen mit Hilfe der stark positiv geladenen, hydrophilen C-terminalen Domäne wahr. Die stark negative, hydrophile N-terminale Domäne ist für die Einstellung des Aktivitätsoptimums verantwortlich [Peter *et al.*, 1998a]. Durch Strukturaufklärung und Wechselwirkungsuntersuchungen dieser terminalen Extensionen sollte der molekulare Vorgang der Wahrnehmung von plötzlich eintretenden hyperosmotischen Bedingungen besser verstanden werden.

### 4.1 Strukturuntersuchungen am Sensor und Modulator

Die heterolog in *E. coli* synthetisierten und anschließend gereinigten Peptide der N- und C-terminalen Domäne von BetP wurden mit CD- und NMR-Spektroskopie unter dem Aspekt der Strukturbildung untersucht. Dabei zeigte sich, dass die komplette C-terminale Domäne in Anwesenheit von SDS-Mizellen einen hohen Anteil  $\alpha$ -helikaler Struktur ausbildet. Dies zeigte sich im CD-Spektrum durch zwei ausgeprägte Minima bei 208 und 220 nm und einem Maximum bei 193 nm (**Abb. 3.2**). Diese Extrema sind typisch für  $\alpha$ -helikale Strukturen [Chen *et al.*, 1972; Gans *et al.*, 1991]. In wässriger Lösung jedoch ist diese Extension unstrukturiert und wird durch ein negatives Maximum bei 200 nm charakterisiert. Die N-terminale Domäne zeigte nach SDS-Zugabe ebenfalls die Bildung einer  $\alpha$ -helikalen Struktur (**Abb. 3.7**). Zur Kontrolle wurden die Strukturen der Extensionen mit TFE vermessen. Peptide, die in Lösung nur zur  $\alpha$ -helikalen Strukturausbildung neigen, aber diese noch nicht ausbilden, falten sich ab 20 % TFE und erreichen maximale Strukturausbildung in Anwesenheit von 50 % TFE [Jasanoff und Fersht, 1994]. Die C- und N-terminalen Domänen bildeten erst mit 40 % TFE  $\alpha$ -helikale Struktur (**Abb. 3.3**; **Abb. 3.8**). Allerdings wurde mit 40 % TFE im Gegensatz zu Mizellen nur 30 %  $\alpha$ -helikale Struktur berechnet, daher ist anzunehmen, dass die  $\alpha$ -helikale Struktur in wässriger Lösung nicht die energetisch günstigste einzunehmende Struktur für beide Extensionen ist [Lau *et al.*, 1984; Sonnichsen *et al.*, 1992]. Anhand der

Aminosäuresequenz der beiden Extensionen ist zu erkennen, dass die C-terminale Domäne kein Prolin enthält, die N-terminale Domäne jedoch fünf Proline. Vier der fünf Proline sind in den ersten 17 Aminosäuren enthalten und das fünfte an der 33sten Stelle der Aminosäuresequenz. Für Prolin ist beschrieben, dass diese Aminosäure  $\alpha$ -helikale Strukturen destabilisiert [Zhou *et al.*, 1994]. Dies kann den geringeren berechneten  $\alpha$ -helikalen Strukturanteil in der N-Extension in Anwesenheit von Mizellen erklären. Bei der N-Extension konnte eine Abhängigkeit der Mizellen-bildenden Substanzen von dem Anteil an ausgebildeter  $\alpha$ -helikaler Struktur beschrieben werden. Dabei war der Anteil an Sekundärstruktur in Anwesenheit von SDS-Mizellen größer als in Anwesenheit von DPC- oder C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>-Mizellen. Die SDS-Mizelle bildet einen hydrophoben Kern, der von einer stark negativ geladenen Oberfläche abgeschirmt wird. Diese geladene Oberfläche scheint die Strukturausbildung zu begünstigen. Dagegen ist DPC zwitterionisch und C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> ungeladen. Im Gegensatz zu SDS erzeugt die DPC-Mizelle ein schwächeres elektrostatisches Feld auf der Mizellenoberfläche, was sich nicht günstig auf die Faltung auswirkt [Mayo *et al.*, 1987].

Mit der NMR-Spektroskopie konnte die Anlagerung beider Extensionen an Mizellen bestätigt werden. Die beobachtete Verschiebung der Signale wurde als Strukturänderung interpretiert. Aufgrund zu hoher Beweglichkeit der Extensionen konnten beide Strukturen allerdings nicht bestimmt werden (3.4). Die Induzierbarkeit von Sekundärstruktur in Peptiden durch SDS und deren Stabilisierung ist schon seit langem bekannt, vor allem die Stabilisierung von  $\alpha$ -Helices [Reynolds und Tanford, 1970]. SDS-Mizellen finden weite Verwendung zur Untersuchung von Membranpeptiden, weil sie durch die negative Oberfläche eine anionisch geladene Membranoberfläche mit polaren Kopfgruppen gut nachahmen. Durch Interaktion der Peptide mit SDS kann so das strukturbildende Potenzial der Peptide ermittelt werden. Da ebenfalls durch SDS  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen stabilisiert werden können [Najbar *et al.*, 1997], muss davon ausgegangen werden, dass die C- und N-terminalen Domänen nicht in der Lage sind,  $\beta$ -Faltblätter auszubilden. Dies ließ sich auch an der C-Extension mittels IR-Spektroskopie abschätzen (3.3). Beide terminalen Domänen formen erst oberhalb der kritischen Mizellenkonzentration ihre Sekundärstruktur aus. Eine Mizellenoberfläche wird somit zur Strukturbildung benötigt. Montserret *et al.* (2000) berichten von zwei chemisch synthetisierten Peptiden, die hinsichtlich ihrer Ladung und Hydrophilie gleiche Eigenschaften wie die Extensionen von BetP haben, dass sie sich mit SDS stark  $\alpha$ -helikal falten. Wie die untersuchten terminalen Domänen sind sie stark negativ oder stark positiv geladen. Die Peptidsequenzen stammen aus einem Helixbereich des humanen Blutplättchenfaktors 4 und benötigen zur Strukturbildung eine ionische Oberfläche. Im „sauren“ Peptid ist die Strukturausbildung

oberhalb von pH 1,8 nicht möglich. Die Säuregruppen müssen somit protoniert sein. Die N-terminale Domäne, die ebenfalls stark sauer ist, zeigte dieses Phänomen nicht. Die C-terminale Domäne verhält sich genauso wie das untersuchte „saure“ Peptid, denn schon unterhalb der kritischen Mizellenkonzentration bildet sie  $\alpha$ -helikale Anteile aus. Mit 50 % TFE konnte im „basischen“ Peptid des Blutplättchenfaktors 4 der gleiche hohe Sekundärstrukturanteil induziert werden wie bei der N-Extension von BetP mit Mizellen. Die strukturbildenden Bereiche in der C-Extension konnten anhand der CD- und NMR-Spektren auf die 35 membranständigen Aminosäuren der C-Extension beschränkt werden. Ein hieraus chemisch synthetisierte Peptid (C-35) bildete auch ohne Oberflächen schon eine  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur aus. Die C-terminalen Verkürzungen mit den endständigen 12 und 21 Aminosäuren scheinen hingegen immer entfaltet zu sein, da bei ihnen im NMR in Anwesenheit von SDS keine  $\alpha$ -helikale Struktur zu identifizieren war. Die Anlagerung der kompletten C-terminalen Domäne an Mizellen wurde mit der NMR-Spektroskopie durch Verbreiterung der einzelnen Signale und mit der Dynamischen Lichtstreuung untermauert (3.4/3.5). Hierbei konnte die Anbindung des C-35-Peptids ohne Strukturveränderung an Mizellen nachgewiesen werden. Die Struktur des C-35-Peptids scheint somit hauptsächlich für den Aktivitätserhalt notwendig zu sein, nicht aber für die Sensorfunktion. Die Sensorfunktion ist mit den letzten 21 Aminosäuren verknüpft, die den strukturell flexibelsten Teil der C-Extension darstellen und möglicherweise mit einem Signalgeber interagieren.

Bei anderen osmotisch regulierten Transportern wird der C-terminalen Domäne ebenfalls eine Sensorfunktion zugesprochen. So haben Untersuchungen an EctP aus *C. glutamicum*, einem Transporter der gleichen Familie wie BetP, in ganzen Zellen gezeigt, dass die 108 Aminosäuren lange negativ geladene C-Extension ohne Osmostress inhibierende Funktion beinhaltet und unter Osmostress EctP aktiviert [Steger, persönliche Mitteilung]. ProP aus *E. coli*, allerdings aus der MFS-Familie, enthält ebenfalls eine lange C-terminale Domäne (66 AS). Eine Deletionsmutante mit Deletion von 26 terminalen Aminosäuren dieser Extension war *in vivo* inaktiv [Culham *et al.*, 2000]. Das chemisch synthetisierte Peptid, bestehend aus den endständigen 44 Aminosäuren der C-Extension von ProP, zeigte in CD- und Sedimentationsstudien in wässriger Lösung *coiled coil*-Struktur. Die *coiled coil*-Struktur konnte als ein homomeres paralleles *coiled coil* bestimmt werden. Die Zerstörung dieser Struktur durch einzelne Aminosäureaustausche *in vitro* führte zur Inaktivierung von ProP. Obwohl dynamische *coiled coils* in großer Zahl für biologisch-regulatorische Phänomene beschrieben wurden [Oas *et al.*, 1994; Ho *et al.*, 1994; Buch *et al.*, 1990], ist diese Strukturbildung in den Extensionen von BetP unwahrscheinlich, da die Extensionen keine Identitäten zueinander zeigen. *Ab initio*-

Faltungsvorhersagen zur C-terminalen Domäne von BetP ergaben ebenfalls keine *coiled coil*-Struktur [Huang *et al.*, 1999].

## 4.2 Interaktionspartner der terminalen Domänen

Nachdem die terminalen Domänen von BetP durch Anlagerung an Mizellen Sekundärstruktur ausbilden, ist nun vorstellbar, dass auch eine Interaktion mit der Cytoplasmamembran *in vivo* erfolgt. Hinweise gaben Coexpressionsstudien von BetP ohne C-terminale Domäne und der C-Extension in *E. coli*. Nach Synthese beider Proteine wurde die lösliche C-terminale Domäne im Westernblot nur in der Membranfraktion wiedergefunden [Morbach, persönliche Mitteilung]. Damit könnte die Membran der Zelle ein Interaktionspartner beider terminalen Domänen von BetP im inaktiven Zustand sein. *In vitro*-Untersuchungen mit der *Resonant Mirror*-Spektroskopie beschrieben quantitativ die Anbindung der C-terminalen Domäne an verschiedene Phospholipidschichten (3.6.2.2). Dabei wurden Lipide gewählt, die in der Cytoplasmamembran von *E. coli* und *C. glutamicum* vorkommen. Die Affinität der C-terminalen Domäne zu diesen Lipiden war sehr hoch ( $K_D = 0,8 - 3 \mu\text{M}$ ). Eine ähnlich hohe Affinität ( $K_D = 5 \mu\text{M}$ ) zu Lipiddoppelschichten wurde mit *Resonant Mirror*-Messungen von dem Lungenoberflächenprotein SP-A an Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (DPPC) beschrieben [Meyboom *et al.*, 1999]. Die Lungenoberfläche besteht aus 90 % Lipid und 10 % Proteinanteil. Neben zwei anderen Proteinen bindet SP-A auch *in vivo* fest an die Lipide der Lungenoberfläche. Hinsichtlich der Anbindung der C-terminalen Domäne an die unterschiedlichen Lipide konnten Abstufungen festgestellt werden. Die Affinität zu Phosphatidylglycerol (Hauptkomponente der Phospholipide in *C. glutamicum*) war etwas stärker als zu *E. coli*-Lipiden oder deren Hauptkomponente (Phosphatidylethanolamin) und der permethylierten Form (Phosphatidylcholin) (**Tab. 3.10**). In ganzen Zellen und in Proteoliposomen konnte ein zu höherer Osmolarität verschobenes Aktivitätsmaximum von BetP mit zunehmender Phosphatidylglycerolkonzentration gemessen werden [Peter *et al.*, 1998a; Rübenhagen *et al.*, 2000]. Diese Daten zusammen mit den Interaktionsstudien könnten durch folgendes Modell erklärt werden: Das Aktivitätsoptimum von BetP korreliert mit der unterschiedlichen Bindefestigkeit der C-terminalen Domäne zu den Kopfgruppen der Lipiddoppelschicht. Dabei hat die höhere Affinität der Extension zu Phosphatidylglycerol eine Verschiebung des Aktivitätsoptimums von BetP zu höheren Osmolaritäten zur Folge. Damit steht die Vorstellung im Einklang, daß die Loslösung der C-terminalen Domäne oder die Veränderung der durch Bindung eingenommenen Struktur die Aktivierung von BetP hervorruft. Die verkürzten Peptide der C-Extension konnten zur näheren Beschreibung der selektiven Bindung an die Oberflächen nicht herangezogen werden.

Ein Einfluss der Oberflächenladung auf die Aktivität von osmoregulierten Systemen wurde auch bei einem weiteren Transporter beobachtet. So zeigt der osmoregulierte Transporter OpuA aus *L. lactis* ebenfalls eine Aktivitätsabhängigkeit von der Oberflächenladung der umgebenden Lipiddoppelschicht. Unter isoosmolaren Bedingungen konnte die Aktivität von OpuA durch die Zugabe von Lokalanästhetika mit unterschiedlichen Kopfgruppenladungen reguliert werden. So führte die Einführung von positiven Oberflächenladungen zur Erhöhung der Aktivität von OpuA unter isoosmolaren Bedingungen [Poolman, persönliche Mitteilung]. Negativ geladene Anästhetika inhibierten den Transporter. Eine Beeinflussung der Aktivität von BetP und auch von EctP konnte mit Anästhetika (Tetracain) ebenfalls beobachtet werden [Rübenhagen *et al.*, 2000; Steger, persönliche Mitteilung]. Die Art der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen Proteinanteilen der Transporter und der Membran scheint somit für die Aktivierbarkeit unter Osmostress wichtig zu sein.

Die C-terminale Domäne scheint also im inaktiven Zustand von BetP an die Membranoberfläche zu binden, wobei die Festigkeit der Bindung durch die Kopfgruppen bestimmt wird. Nachdem nun ein hyperosmotischer Reiz die angebundene C-terminale Domäne erreicht hat, muss davon ausgegangen werden, daß diese Domäne eine Strukturänderung durchmacht oder an andere Interaktionspartner bindet. Einer dieser Interaktionspartner könnte die cytoplasmatische Schleife 8 sein (**Abb. 3.14**). Deren Affinität zur C-terminalen Domäne ist 170fach höher als die des gleichen Peptids mit zufälliger Aminosäuresequenz (**Tab. 3.9**). Innerhalb der Transporter-Familie, zu der BetP zählt, ist diese Schleife am höchsten konserviert. In der achten Transmembranhelix wird das aktive Zentrum vermutet, da dieser Bereich ebenfalls am höchsten konserviert ist [Rübenhagen *et al.*, 2001]. Die Weiterleitung des Signals vom C-terminalen Sensor an diese Schleife 8 zur Aktivierung von BetP ist somit vorstellbar. Weitere Interaktionspartner im *in vitro*-System sind die cytoplasmatischen Schleifen 2 und 4 (**Abb. 3.15; Tab. 3.9**).

Auf der Suche nach dem Signal zur Strukturänderung oder zur Bindungsschwächung der C-terminalen Domäne an der Lipiddoppelschicht wurde die Interaktion der C-Extension zur künstlichen Oberfläche in Anwesenheit verschiedener Ionen und Moleküle untersucht.

### 4.3 Die Wirkung von Soluten auf die C-terminale Domäne

Die Auswirkung der Änderung der Molekülkonzentrationen im Cytoplasma nach einem hyperosmotischen Schock auf die Aktivierung von Osmosensoren ist noch wenig untersucht. So werden veränderte Solut- und Ionenkonzentrationen nach einem Osmoschock im Cytoplasma beobachtet. Nach einem hyperosmotischen Schock

schützen sich Gram-negative wie Gram-positive Bakterien durch Aufnahme und Synthese von kompatiblen Soluten [Kempf und Bremer, 1998]. In *C. glutamicum* wurde dabei nach einem hyperosmotischen Schock mit NaCl im Minimalmedium ein Anstieg von Natriumionen, Glutamat und Trehalose festgestellt [Guillouet und Engasser, 1995]. Dabei sollte untersucht werden, inwieweit solche Substanzen einen Einfluss auf die Wechselwirkung der C-terminalen Domäne mit Doppellipidschichten haben, die mit der Aktivierung von BetP in Zusammenhang stehen könnten. Es zeigte sich, dass die genannten Verbindungen die Interaktion nicht beeinflussten oder, wie bei NaCl, mit zunehmender elektrostatischer Wechselwirkung durch Ionen die Interaktion zur Lipidoberfläche linear abnahm (**Abb. 3.17**). Allerdings führte die Steigerung der K<sup>+</sup>-Konzentration im Puffer bis zu 400 mM zu einer Erhöhung der Affinität der C-Extension zu den Lipiden und ab 400 mM zu einer sprunghaften Abnahme der Affinität (**Abb. 3.18**). Vermutet wird, dass die Anbindung des C-terminalen Sensors von BetP an die Cytoplasmamembran somit abhängig von der internen K<sup>+</sup>-Konzentration ist. Diese Kaliumsensitivität führte mit BetP im Liposomensystem zur Aktivierung von BetP [Rübenhagen *et al.*, 2001]. Die Reaktion der C-terminalen Domäne auf Kalium konnte auf die endständigen 21 Aminosäuren eingegrenzt werden. Dieses Peptid reagiert in gleicher Weise auch auf NaCl und zeigte diesen Sprungeffekt schon zwischen 200 mM (KCl) und 300 mM (NaCl), während das membranständige Peptid nicht auf diese Ionen reagierte (**Abb. 3.23**). Die Wirkung von Na<sup>+</sup> auf die Aktivität von BetP konnte in Proteoliposomen nicht untersucht werden, weil Na<sup>+</sup> das Cosubstrat von BetP ist und damit die Aufnahmerate beeinflusst. Aktivitätsstudien an einer Transportermutante von BetP, bei der die letzten 23 Aminosäuren der C-terminalen Domäne deletiert sind, zeigten eindeutig, dass kein Kalium mehr detektiert wird (Schiller, persönliche Mitteilung). Wenn allerdings nur die letzten 12 Aminosäuren fehlten, führte dies schon zur Deregulation von BetP [Peter, 1997]. Es reicht schon aus, die letzten 12 Aminosäuren in der C-terminalen Domäne an eine andere Position zu versetzen, um den Transporter zu deregulieren [Morbach, mündliche Mitteilung].

Ein durch bestimmte Ionen hervorgerufenos osmotisches Signal wurde auch bei anderen osmotisch regulierten Sensorproteinen gefunden. So konnte an OpuA aus *L. lactis* gezeigt werden, dass der Transporter im rekonstituierten System ebenfalls durch eine steigende interne Ionenkonzentration aktivierbar ist. Dabei reichten schon 200 mM KPi um eine maximale ATPase-Aktivität zu erreichen, wohingegen nichtionische Verbindungen keinen Einfluss auf die Aktivität hatten [Poolman, persönliche Mitteilung]. In diesem Organismus ist allerdings eine Akkumulation von Kalium oder anderen Ionen nach einem hyperosmotischen Schock nicht beschrieben worden.

*In vivo*-Studien an ProP aus *E. coli* ergaben ebenfalls eine Abhängigkeit der Aktivität von Kalium im Medium, wobei es sich aber um geringe äußere  $K^+$ -Konzentrationen handelte [Koo *et al.*, 1991]. Der Reiz für diesen Transporter konnte noch nicht definiert werden und der Einfluss interner Ionen wurde an ProP noch nicht untersucht. Allerdings wird das Schrumpfen der Zellen als Signal vermutet, da membranpermeable Verbindungen wie PEG 150 und PEG 200 ProP in Proteoliposomen aktivieren konnten [Racher *et al.*, 2001].

Das Zweikomponenten-System EnvZ/OmpR detektiert ebenfalls cytoplasmatische Ionen. Jung *et al.* (2001a) konnten mit *right-side-out membrane vesicles* (RSO-MV) aus *E. coli* zeigen, dass interne monovalente Kationen (besonders Kalium) die Autokatalyse von rekonstituiertem EnvZ auslösen. Weiterhin wurde mit Kalium auch die Phosphorylierung von OmpR aktiviert. Wie eine erhöhte monovalente Ionenkonzentration cytoplasmatisch gemessen wird und die Autophosphorylierung erfolgt ist allerdings noch unklar.

Und auch bei KdpD aus *E. coli* konnte in *in vitro*-Phosphorylierungsstudien mit invertierten Membranvesikeln und Proteoliposomen die Autophosphorylierung von KdpD durch Ionen aktiviert werden. Dabei waren KCl und NaCl wirksam. Im *right-side-out membrane vesicles* (RSO-MV)-Testsystem, in dem KdpD die gleiche Orientierung wie in ganzen Zellen hat, sind die interne Kaliumkonzentration und die Ionenstärke direkt an die KdpD-Autophosphorylierung gekoppelt [Jung *et al.*, 2000]. Kalium wirkt inhibierend und Ionenstärke aktivierend. Da KdpD  $K^+$ -Mangel detektiert um dann die Expression der Gene für einen Kalium-Transporter auszulösen, entspricht dies der physiologischen Funktion. Die Wahrnehmung der Osmolarität kann dann durch Natriumionen-Detektion erfolgen. Weiterhin aktiviert externes Cäsium die Expression von *kdpFABC* bei gleichzeitiger Verringerung von internem Kalium [Jung *et al.*, 2001b]. Die höchste Stimulation der Autophosphorylierung wurde mit NaCl und KCl außen erreicht. Zucker haben nur einen geringen oder keinen Effekt auf die Aktivierung von KdpD.

Dass die Detektion interner Ionenkonzentrationen nicht alleine das osmosensorische Signal für osmoregulierte Proteine sein kann, zeigen Untersuchungen am mechanosensitiven Kanal MscL aus *M. tuberculosis*. Dieser Kanal wird durch Zugabe von positiv geladenen Anästhetika, wie Tetracain und Chlorpromazin, wie auch mit dem anionischen Dipyramidol in *patch-clamp*-Untersuchungen an *E. coli*-Sphäroplasten aktiviert. Die Öffnung des Kanals wird mit der Verringerung der Zugkräfte in der Membran erklärt, was mit einem hyposmotischen Schock übereinstimmt [Martinac *et al.*, 1990]. In BetP kann die aktivierende Wirkung von Tetracain auch mit der Veränderung der Zugkräfte in der Membran erklärt werden. Die Wirkung kann allerdings auch mit der Wechselwirkung der methylierten Ammoniumkopfgruppe des Tetracains zur C-Extension

beschrieben werden. Rübenhagen (2001) konnte eine Abhängigkeit der BetP-Aktivität von der Ladung des Tetracains beobachten. Da die Radien von Ammonium, Kalium, Rubidium und Cäsium vergleichbar sind [Rübenhagen, 2001], könnten die methylierten Ammoniumkopfguppen die Kaliumbindung imitieren.

Für *E. coli* wurde in den achtziger Jahren erstmals beschrieben, dass osmoregulierte Prozesse von der internen  $K^+$ -Konzentration abhängen können [Sutherland *et al.*, 1987]. Dabei wurde die Abhängigkeit der Expression des osmoregulierten *proU*-Gens von der internen  $K^+$ -Konzentration nachgewiesen. Die Regulation von osmoregulierten Proteinen auf Aktivitätsebene, wie sie erstmals an KdpD und EnvZ gezeigt werden konnte, wurde ebenfalls schon vorgeschlagen [Higgins *et al.*, 1987; Booth und Higgins, 1990]. In *C. glutamicum* wurden bislang allerdings nie Kaliumionen als beteiligtes kompatibles Solut bei der Antwort auf einen hyperosmotischen Schock detektiert [Kawahara *et al.*, 1989; Frings *et al.*, 1993]. Inwieweit Kaliumionen in der hyperosmotisch geschockten Zelle am Schutzmechanismus beteiligt sind, sollte daher durch interne Kalium-, Aminosäure- und Volumenmessungen beschrieben werden.

#### 4.4 Interne Kaliumionenkonzentration als osmotisches Signal

In verschiedenen *in vitro*-Studien konnte der Einfluss einer gesteigerten  $K^+$ -Konzentration auf BetP beschrieben werden. Während ein Schwellenwert von 400 mM  $K^+$  zur Ablösung der C-terminalen Domäne von der Lipidoberfläche führte, sind von Rübenhagen *et al.* (2001) halbmaximale Transportaktivitäten von BetP durch den Anstieg der internen  $K^+$ -Konzentration auf 220 mM in Proteoliposomen bestimmt worden. Eine steigende Kaliumkonzentration nach einem hyperosmotischen Schock wurde allerdings in *C. glutamicum* noch nicht beobachtet. Aus diesem Grund wurde im Wildtyp *C. glutamicum* die Auswirkung eines hyperosmotischen Schocks auf die interne Kaliumkonzentration untersucht. Dazu wurden die internen Aminosäuren und das Zellvolumen bestimmt und die Aktivität von BetP unter physiologischen Bedingungen gemessen. Dabei wurde ein signifikanter Abfall des Zellvolumens, gefolgt von einem Anstieg an internem  $K^+$  und Glutamat innerhalb von Minuten nach einem Schock beobachtet. Der Schwellenwert von 400 mM Kaliumionen, der die Affinität der C-Extension zu den Lipiden *in vitro* beeinflusst, war allerdings *in vivo* im hochosmolaren Medium schon vor dem Schock überschritten. Qualitativ konnte gezeigt werden, dass mit steigender Kaliumkonzentration direkt nach einem Schock die BetP-Aktivität zunahm. Die Aktivität von BetP korrelierte in weiten Bereichen mit der gestiegenen Kaliumionenkonzentration und mit der Konzentration zu dem putativen Gegenion zu Kalium, Glutamat. Nach einigen Stunden wurden diese Verbindungen durch synthetisiertes Prolin ersetzt. Unter Bedingungen konstant bleibender Osmolarität war von *C. glutamicum* bekannt, dass keine Abhängigkeit



der Glutamat- und Kaliumionenkonzentration von der externen Osmolarität besteht [Guillouet und Engasser, 1995, Rönsch, 2000]. Für ungestresste Zellen in 0,6 osmol/kg sind interne Glutamatkonzentrationen von 120 mM beschrieben und die Summe der untersuchten kompatiblen Solute wurde auf unter 300 mM berechnet [Skjerdal *et al.*, 1996]. In dieser Arbeit wurden die Langzeitwerte für internes Kalium und Glutamat ebenfalls erreicht, allerdings erst im Anschluss an die beobachtete Kaliumantwort. Interessanterweise wurden in *C. glutamicum* schon Kaliumionen-abhängige Regulationsphänomene beschrieben. So ist der aktive Import von Glutamat auch an einen Schwellenwert von 200 mM internem Kalium gekoppelt [Krämer *et al.*, 1990]. In Anwesenheit von Glycinbetain im Medium verringerte sich die Glutamatsynthese nur geringfügig. Im hochosmolaren Medium wurde nach dem Schock in Anwesenheit von Glycinbetain ein Drittel weniger Glutamat akkumuliert als ohne Glycinbetain. Die Glutaminakkumulation wurde halbiert. Die Kaliumakkumulation halbierte sich ebenfalls in MMI-Medium. In *E. coli* bewirkt die Anwesenheit von 1 mM Glycinbetain im Medium eine Verringerung der Kaliumakkumulation um 20 % und eine Erniedrigung der Glutamatsynthese um 65 % [Cayley *et al.*, 1992]. Die Prolinakkumulation steigerte sich in *C. glutamicum* ebenfalls durch Glycinbetain langsamer, wie schon von Kawahara *et al.* (1990) beschrieben wurde. Die Glycinbetainakkumulation erreichte dafür in *E. coli* 1170  $\mu\text{mol/g}$  TG. Glutamat macht nur 24 % der durch Kalium benötigten Gegenladung aus. In *C. glutamicum* erreicht die Glutamatkonzentration dagegen bis zu 40 % der  $\text{K}^+$ -Konzentration (3.7.1). Unter der Annahme, dass ein Glutamat mit den zwei Carboxylgruppen zwei Kaliumionen bindet, wäre in *C. glutamicum* ein Ladungsausgleich der positiv geladenen Kaliumionen durch Akkumulation von Glutamat vorstellbar. Bei dem Vergleich der Daten von *E. coli* und *C. glutamicum* muss beachtet werden, dass *E. coli* nur bis 1,4 osmol/kg [McLaggan *et al.*, 1990] ohne kompatible Solute wächst und mit kompatiblen Soluten nur bis über 2 osmol/kg [Measures, 1975]. Allerdings ist neben *E. coli* auch im Gram-positiven *B. subtilis* eine aktive Aufnahme von Kalium als erste Antwort auf einen hyperosmotischen Schock beschrieben [Whatmore *et al.*, 1990]. Das Gegenion zu Kalium ist aber unbekannt.

Nach der Kaliumantwort reduziert *E. coli* die cytoplasmatische Konzentration an Kaliumglutamat und Trehalose, und ersetzt Kalium durch Putrescin (ein zweifach positiv geladenes Polyamin) zur Minimierung des Turgordrucks unter niedrigosmolaren Bedingungen [Record *et al.*, 1998a]. In *C. glutamicum* wurde langfristig ebenfalls Kalium und Glutamat, wie auch Glutamin durch Prolin ersetzt [Guillouet und Engasser, 1995a/b]. Abschließend kann gesagt werden, dass Glycinbetain in *C. glutamicum* die Akkumulation von Kalium- und Glutamat verringert, die langfristige Anpassung auf

hyperosmotische Bedingungen durch Prolin mit unterstützt und in kürzerer Zeit wieder ein optimales Wachstum ermöglicht.

Da die Absolutmenge an internem Kalium ohne Einrechnung einer möglichen Volumenverringering nach einem hyperosmotischen Schock zunimmt, muss ein aktiver Kaliumtransport postuliert werden. In Aktivierungsexperimenten mit BetP, eingebaut in ein System mit festkörpergestützten Membranen, konnte aber die Wahrnehmung des Stresssignals und der Transport mit einer Zeitauflösung von 70 ms bestimmt werden. In dieser kurzen Zeit ist eine Kaliumakkumulation durch aktiven Transport nicht vorstellbar [vergleiche Trchounian und Kobayashi, 1999]. Somit wurde untersucht, ob eine Volumenverringering der Zelle und die damit verbundene Erhöhung der internen Kaliumkonzentration alleine schon beobachtet werden kann, ohne einen aktiven Kaliumtransport zur BetP-Aktivierung zu fordern.

In dieser Arbeit konnte das Zellvolumen von *C. glutamicum* in Minimalmedium bei 0,4 osmol/kg auf 1  $\mu\text{l}/\text{mg}$  TG bestimmt werden. Dabei fiel auf, dass zu Beginn der exponentiellen Phase das Zellvolumen kontinuierlich zunahm. Unter konstanten Osmolaritäten ist das cytoplasmatische Zellvolumen in *C. glutamicum* während der exponentiellen Phase am höchsten und abhängig von der Osmolarität im Medium [Rönsch, 2000]. Nach einem hyperosmotischen Sprung von 0,3 osmol/kg auf 1,8 osmol/kg fiel das Zellvolumen innerhalb von Minuten auf mindestens 40 % des ursprünglichen Zellvolumens ab und erreichte erst wieder das ursprüngliche Volumen von 1  $\mu\text{l}/\text{mg}$  TG nach 60 - 90 min. Zellvolumenuntersuchungen an *C. glutamicum* mit Lichtstreuung ergaben ähnliche Ergebnisse. Bei dem gleichen hyperosmotischen Schock verringerte sich das Zellvolumen innerhalb der ersten Minute um 40 % [Guillouet und Engasser, 1996]. Hyperosmotische Sprünge von 0,4 osmol/kg auf 2, 2,55 und 3,3 osmol/kg führten zu anfänglichen Zellvolumeneinbrüchen von 45, 55 und 70 %. Unter allen Bedingungen außer bei 3,3 osmol/kg hatten die Zellen innerhalb von 15 min das ursprüngliche Volumen wieder hergestellt.

Somit würde die Verringerung des Zellvolumens schon ausreichen, um die interne Kaliumkonzentration ohne aktive Aufnahme von  $\text{K}^+$ -Ionen zu verdoppeln. Die Aktivierung von BetP durch internes Kalium *in vivo* ist somit leicht erklärbar.

In *E. coli* verringert sich das Cytoplasmavolumen linear mit steigender externer Osmolarität. Die interne Kaliumionenkonzentration steigt linear mit steigender Osmolarität und damit erhöht sich das Cytoplasmavolumen linear mit steigendem internen Kaliumionengehalt im Bereich von 0,5 bis 1,0  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  TG [Cayley *et al.*, 1992]. Obwohl das Cytoplasmavolumen in *E. coli*-Zellen unter hyperosmolaren Bedingungen abnimmt (Plasmolyse), bleibt das totale Zellvolumen, das aus dem cytoplasmatischen und

dem periplasmatischen Zellvolumen besteht, relativ konstant [Stock *et al.*, 1977]. Im Wachstumszustand der Zellen ist allerdings das Verhältnis zwischen Periplasmavolumen und dem totalen Zellvolumen immer gleich. Das Periplasma enthält zwischen 20 - 40 % des totalen Zellwassers. Die Bestimmung des cytoplasmatischen Volumens in *E. coli* ergab 1,3  $\mu\text{l}/\text{mg TG}$  bis 1,8  $\mu\text{l}/\text{mg TG}$  [Castle *et al.*, 1986]. Schnellstes Wachstum von *E. coli* wird bei 0,3 osmol/kg erreicht. Diese Osmolarität gilt somit als isoosmolar für *E. coli*. Der dabei aufgebaute Turgordruck entspricht einer Atmosphäre [Record *et al.*, 1998a]. *C. glutamicum*-Zellen enthalten die geringsten Konzentrationen an kompatiblen Soluten um 0,3 osmol/kg [Wolf, persönliche Mitteilung], somit scheint diese Osmolarität ebenfalls isoosmolar für *C. glutamicum* zu sein. Nach einem hyperosmotischen Schock auf über 1 osmol/kg mit Saccharose schrumpfte das Cytoplasmavolumen in *E. coli* auf nur noch 20 % des totalen Zellvolumens und das Periplasma nimmt 80 % ein.

In einigen Gram-positiven Bakterien ist der einsetzende Wasserausstrom nach einem Schock nur abhängig von der Differenz des Turgordrucks und des äußeren osmotischen Druckes. Durch das Fehlen einer zweiten Lipidschicht fehlt ihnen der periplasmatische Raum und somit wird keine Plasmolyse beobachtet. *C. glutamicum* enthält zwar zusätzlich zur Cytoplasmamembran eine Mycolatschicht, die allerdings durch Porine für Moleküle bis 500 Da durchlässig ist. Im Gegensatz zu Gram-negativen Bakterien halten Gram-positive aufgrund ihres höheren internen Aminosäurespiegels wesentlich höhere Osmolaritäten aus. So ist *C. glutamicum* in der Lage bis zu einer Osmolarität von 3,3 osmol/kg zu wachsen [Guillouet und Engasser, 1996].

Zur genaueren Beschreibung des Zusammenhangs zwischen BetP-Aktivierung, Kalium- und Glutamatakkumulation und Volumenverringerung ist es allerdings notwendig, die Parameter in Abhängigkeit zu unterschiedlichen Osmolaritätsänderungen und unterschiedlichen Endosmolaritäten zu quantifizieren.

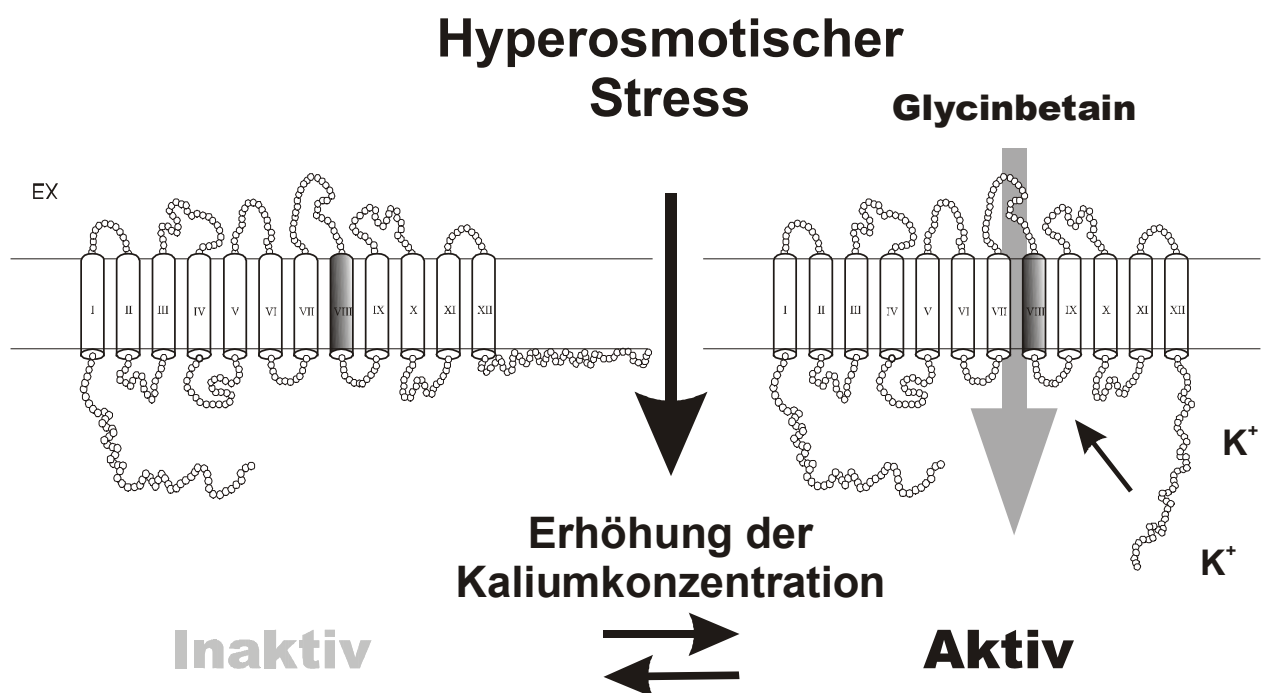
## 4.5 Zeitauflösung der sensorischen Eigenschaften von BetP

Eine weitere Frage war die genaue Zeitauflösung für die Signalwahrnehmung und Umsetzung durch BetP. Dazu wurden Untersuchungen der Aktivierung von BetP nach einem hyperosmotischen Schock mit Hilfe der festkörpergestützten Membranen, an die Proteoliposomen mit BetP adsorbiert sind, durchgeführt. Dabei konnte der Einstrom des Cosubstrats  $\text{Na}^+$  bei einem permanenten hyperosmotischen NaCl-Stress durch Zugabe von Glycinbetain innerhalb von weniger als 70 ms beobachtet werden (3.8). In genau derselben Zeit wurde BetP aktiv, wenn Glycinbetain vorlag und ein hyperosmotischer Schock mit Sorbitol BetP aktivierte. Die zeitlich voneinander abhängigen Prozesse Reizwahrnehmung, Signalweiterleitung, Aktivierung von BetP und Transport werden somit zusammen schneller durchlaufen als in 70 ms und können deshalb unter diesen

Bedingungen nicht aufgelöst werden. Da der Wasserverlust aus den Proteoliposomen sehr schnell (innerhalb von Millisekunden) erfolgt, ist die Detektion der durch die Verringerung des Zellvolumens steigenden internen Kaliumionenkonzentration in dieser kurzen Zeit durch BetP vorstellbar.

#### 4.6 Modell zur Regulation von BetP

Die Ergebnisse der Aktivierung von BetP in ganzen Zellen und in Liposomen und die Struktur- und Interaktionsdaten der C-terminalen Domäne lassen den Schluss zu, dass die Ablösung der C-terminalen Domäne den Aktivierungsprozess von BetP einleitet. Die C-terminale Domäne nimmt somit den Anstieg der  $K^+$ -Konzentration als hyperosmotisches Signal wahr und überträgt dieses Signal an BetP. Dabei kann vermutet werden, dass die C-terminale Domäne im inaktiven Zustand von BetP  $\alpha$ -helikal an der Membran anlagert (**Abb. 4.1**).



**Abb. 4.1** Funktionsmodell der Aktivierung von BetP nach einem hyperosmotischen Schock.

Durch den einwirkenden Stress verringert sich das Volumen der Zelle und konzentriert dadurch die interne Kaliumkonzentration auf. Durch diese erhöhte Kaliumkonzentration wird die Wechselwirkung der C-terminalen Domäne zur Cytoplasmamembran gestört. Dabei ist allerdings noch unklar, ob Kalium aktiv gebunden wird oder die Inhibition der Interaktion zur Lipidoberfläche unspezifisch ist. Die Reaktion auf Kalium muß allerdings

in weniger als 70 ms erfolgen. Nachdem BetP aktiviert ist könnte der einsetzende aktive Kaliumionentransport in die Zelle BetP anschließend im aktiven Zustand halten.

Die *in vivo*-Daten bestätigen zusätzlich eine Steigerung der intrazellulären Glutamatkonzentration als Gegenion für Kalium.

Um dieses Modell weiter zu bestätigen, ist es in Zukunft notwendig, die Änderung der C-terminalen Struktur aufzuklären. Weiterhin sollte durch einzelne Aminosäureaustausche in der C-terminalen Domäne, die sowohl die Struktur der C-terminalen Domäne als auch die Transporteigenschaften von BetP verändern, der Sensormechanismus weiter untersucht werden. Der Verlust der Kaliumsensitivität muss auch zum Verlust der Aktivierung von BetP führen. Dynamische Eigenschaften der Extension sollten auch mit Fluoreszenzspektroskopie detektierbar sein. Schließlich konnte die Orientierung der Extensionen von BetP nicht mit absoluter Sicherheit bestimmt werden [Rübenhagen, 2001]. Der Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter NhaA aus *E. coli* konnte als erster sekundärer Transporter kristallisiert und durch Elektronenkryomikroskopie mit einer Auflösung von 7 Å bestimmt werden. Durch Tertiärstrukturermittlung von BetP könnte die Lage der N- und C-terminalen Domäne und die Anordnung der Helices näher beschrieben werden und damit vielleicht den sensorischen Mechanismus weiter aufklären.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Der sekundäre Transporter BetP aus *Corynebacterium glutamicum* wird als Reaktion auf einen hyperosmotischen Schock aktiviert und transportiert Glycinbetain mit zwei Natriumionen in die Zelle. Eingebettet in eine künstlich hergestellte Doppellipidschicht ist BetP in der Lage, ohne Hilfe weiterer zellulärer Bestandteile den Anstieg der externen Osmolarität wahrzunehmen. Dabei besitzt die C-terminale Domäne des Transporters sensorische Eigenschaften, die zur Aktivierung des Carriers führen, während die N-terminale Domäne modulierend wirkt. Wie die C-terminale Domäne den Reiz des osmotischen Stresses wahrnimmt und an die katalytische Domäne von BetP weiterleitet, war die Fragestellung dieser Arbeit.

Dabei konnten folgende Ergebnisse den Aktivierungsmechanismus näher charakterisieren:

1. NMR- und CD-Untersuchungen ergaben, dass die heterolog synthetisierten terminalen Domänen in wässriger Lösung weitgehend entfaltet waren, allerdings durch Wechselwirkung mit Detergenzmizellen  $\alpha$ -helikale Struktur ausbildeten.
2. Die Anbindung der C-terminalen Domäne an verschiedene Lipidoberflächen konnte quantifiziert werden und war so stark wie die typischer Lipid-bindender Proteine. Dabei war die Affinität zu Phosphatidylglycerol (Hauptkomponente in der Cytoplasmamembran von *C. glutamicum*) geringfügig stärker als zu Phosphatidylethanolamin (Hauptkomponente in der Cytoplasmamembran von *E. coli*) und deren Derivate.
3. In *Resonant-Mirror*-Untersuchungen zeigte sich, dass die Wechselwirkung der C-terminalen Domäne zu Lipidoberflächen ab einem Schwellenwert von 0,4 M  $[K^+]$  unterbunden werden konnte. Dieser inhibitorische Effekt konnte nur durch  $K^+$  oder verwandte Kationen erreicht werden, aber nicht durch Ionen wie  $Na^+$  oder Anionen. Ein Peptid, das nur die 21 endständigen Aminosäuren der C-terminalen Domäne enthielt, wurde durch  $Na^+$  und  $K^+$  in der Wechselwirkung zur Lipidoberfläche gestört. Ein anderes Peptid, bestehend aus den anderen 35 Aminosäuren der membranständigen C-terminalen Seite der Domäne, reagierte nicht auf die Ionen. Aus Proteoliposomen-Studien mit BetP war gezeigt worden, dass BetP nur durch interne  $K^+$ -Akkumulation aktivierbar ist.

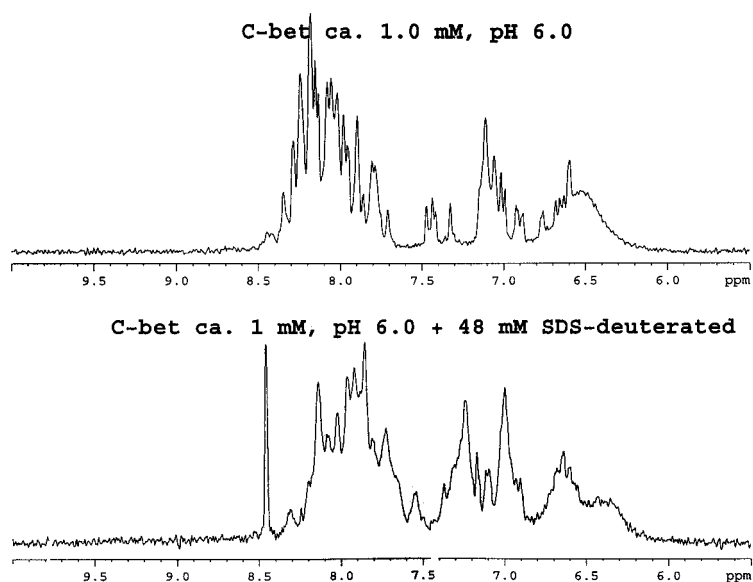
*In vivo*-Untersuchungen sollten zeigen, inwieweit die *in vitro* gewonnenen Daten zur  $K^+$ -Aktivierung von BetP auf die physiologische Antwort von *C. glutamicum* auf hyperosmotischen Stress übertragen werden können.

4. Direkt nach einem hyperosmotischen Schock von *C. glutamicum* in Minimalmedium konnte die erhöhte Aktivität von BetP in Transportmessungen bis zu 90 min gemessen werden. Die Aktivität von BetP war nach 30 min maximal und zeigte unabhängig von der Endosmolarität in verschiedenen Medien den gleichen Verlauf.
5. Wie für *E. coli* und *B. subtilis* konnte in *C. glutamicum* eine Kaliumantwort als unmittelbare Reaktion auf hyperosmotischen Stress gemessen werden. Diese Kaliumantwort war in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit externer kompatibler Solute und von der Endosmolarität im Medium unterschiedlich stark. Die Dauer der K<sup>+</sup>-Akkumulation entsprach dem Zeitraum, in dem auch BetP aktiv war.
6. Zeitgleich zur Kaliumionenakkumulation wurde wie in *E. coli* die Synthese von Glutamat festgestellt. Glutamat erreichte 40 % der Kaliumkonzentration, dies entspricht den prozentualen Mengen, die in *E. coli* gefunden wurden. Glutamat bildet damit einen Teil der Ausgleichsladungen für Kalium. Zeitverzögert wurde für 60 – 90 min Glutamin intrazellulär angehäuft.
7. Sowohl K<sup>+</sup> als auch Glutamat und Glutamin wurden nach einem hyperosmotischen Schock nur vorübergehend akkumuliert. Nach 120 min waren die Ausgangskonzentrationen wieder hergestellt. Der Langzeitschutz wurde durch Akkumulation von Prolin hergestellt.
8. Zusätzlich zum Kaliumanstieg konnte eine Volumenverringerung direkt nach einem hyperosmotischen Schock gemessen werden. Diese Volumenreduktion um 2/3 wurde von den Zellen nach 30 min wieder ausgeglichen. Da sich die Kaliumkonzentration schon ohne Volumenverringerung mindestens verdoppelte, müssen die K<sup>+</sup>-Ionen aktiv durch einen osmoregulierten Kaliumtransport in die Zelle gelangt sein.
9. Mit festkörpergestützten Membranen, an die Proteoliposomen mit BetP adsorbiert waren, konnte die maximale Zeit der Aktivierung von BetP nach Anlegen eines hyperosmotischen Schocks oder nach Substratzugabe unter Permanentschock auf 70 ms bestimmt werden.

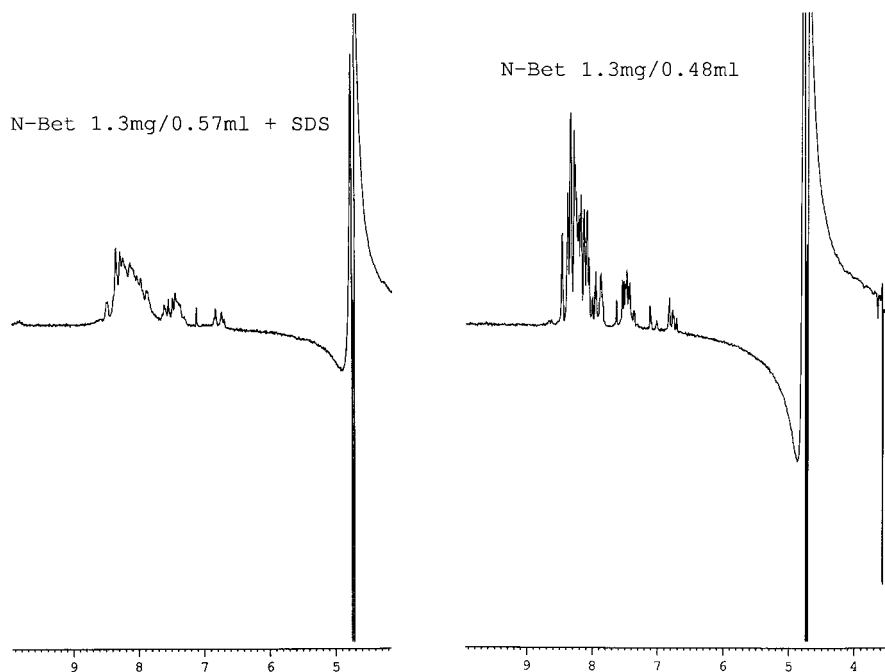
Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen der Kalium-abhängigen Ablösung der C-terminalen Domäne von der Lipidmembran und dem Aktivierungsprozess von BetP *in vivo* hergestellt werden.

## 6. Anhang

### 6.1 Eindimensionale $^1\text{H}$ -NMR-Spektren

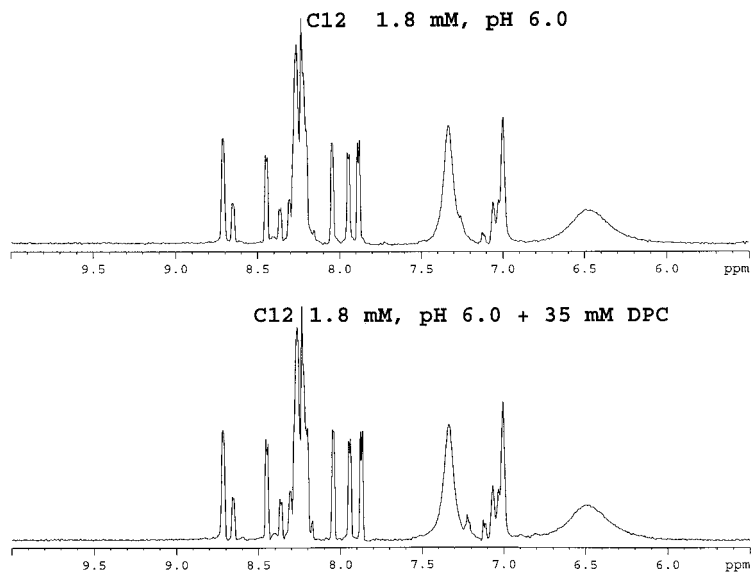


**Abb. 6.1**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der C-terminalen Domäne von BetP in  $\text{NaP}_i$ -Puffer (10 mM, pH 6; oben) und zusätzlich mit deuteriertem SDS (unten).

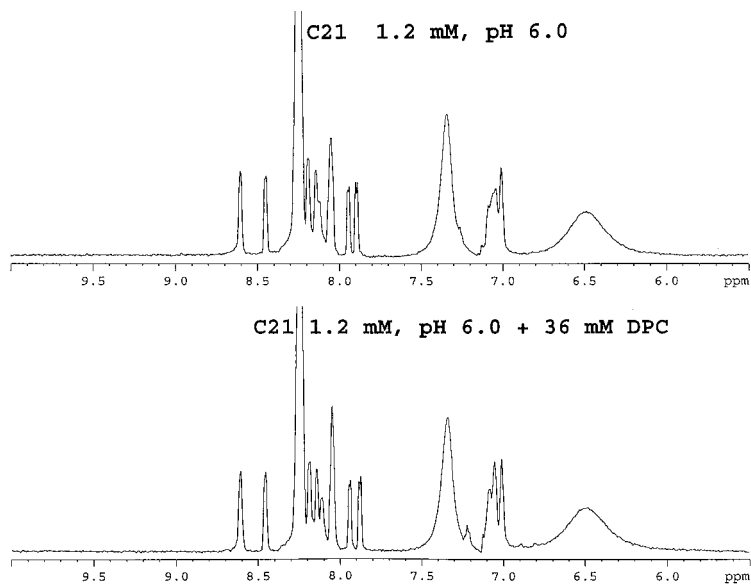


**Abb. 6.2**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der N-terminalen Domäne von BetP in  $\text{NaP}_i$ -Puffer (10 mM, pH 6; rechts) und zusätzlich mit SDS (links).

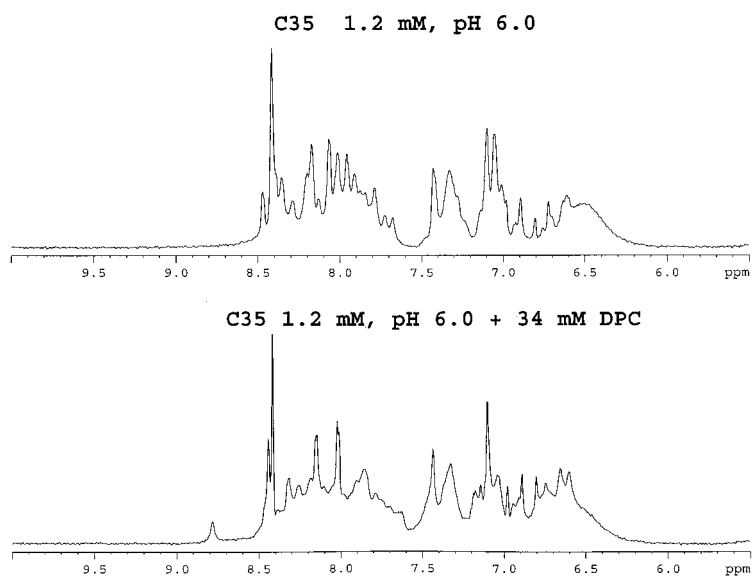




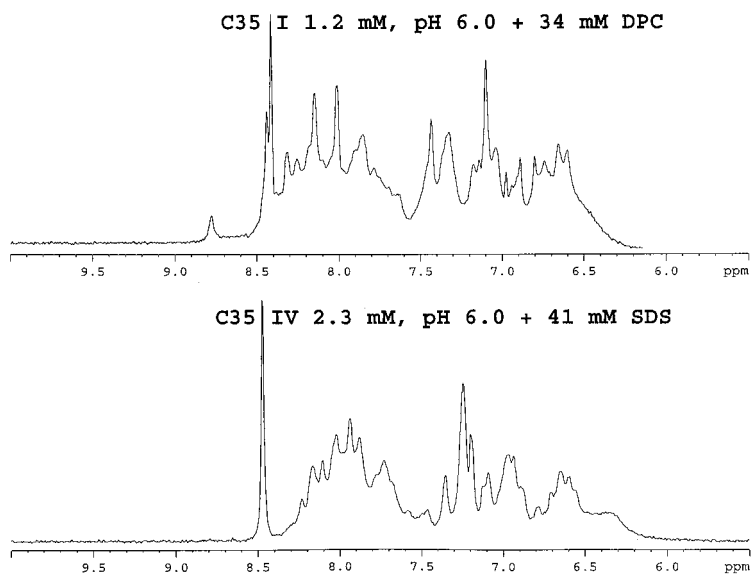
**Abb. 6.3**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Verkürzung C-12 der C-terminalen Domäne von BetP in  $\text{NaP}_i$ -Puffer (10 mM, pH 6) mit (unten) und ohne DPC (oben).



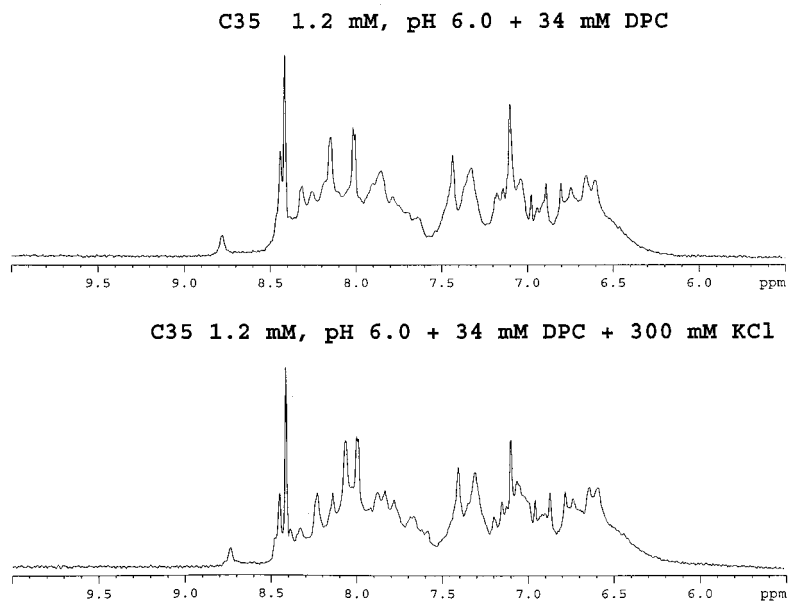
**Abb. 6.4**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Verkürzung C-21 der C-terminalen Domäne von BetP in  $\text{NaP}_i$ -Puffer (10 mM, pH 6) mit (unten) und ohne DPC (oben).



**Abb. 6.5**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Verkürzung C-35 der C-terminalen Domäne von BetP in  $\text{NaP}_i$ -Puffer (10 mM, pH 6) (oben) und in Puffer mit DPC (unten).

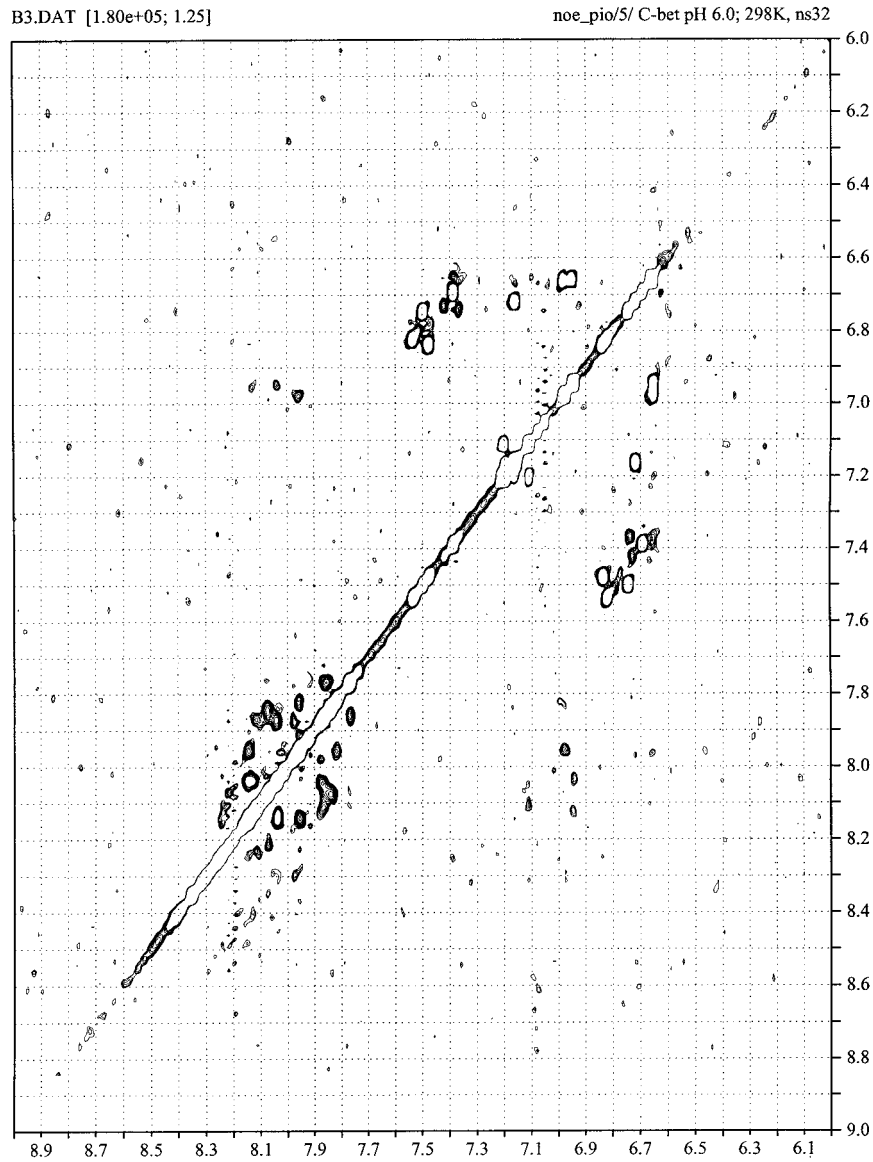


**Abb. 6.6** Vergleich der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Verkürzung C-35 der C-terminalen Domäne von BetP mit DPC (oben) und mit SDS (unten).

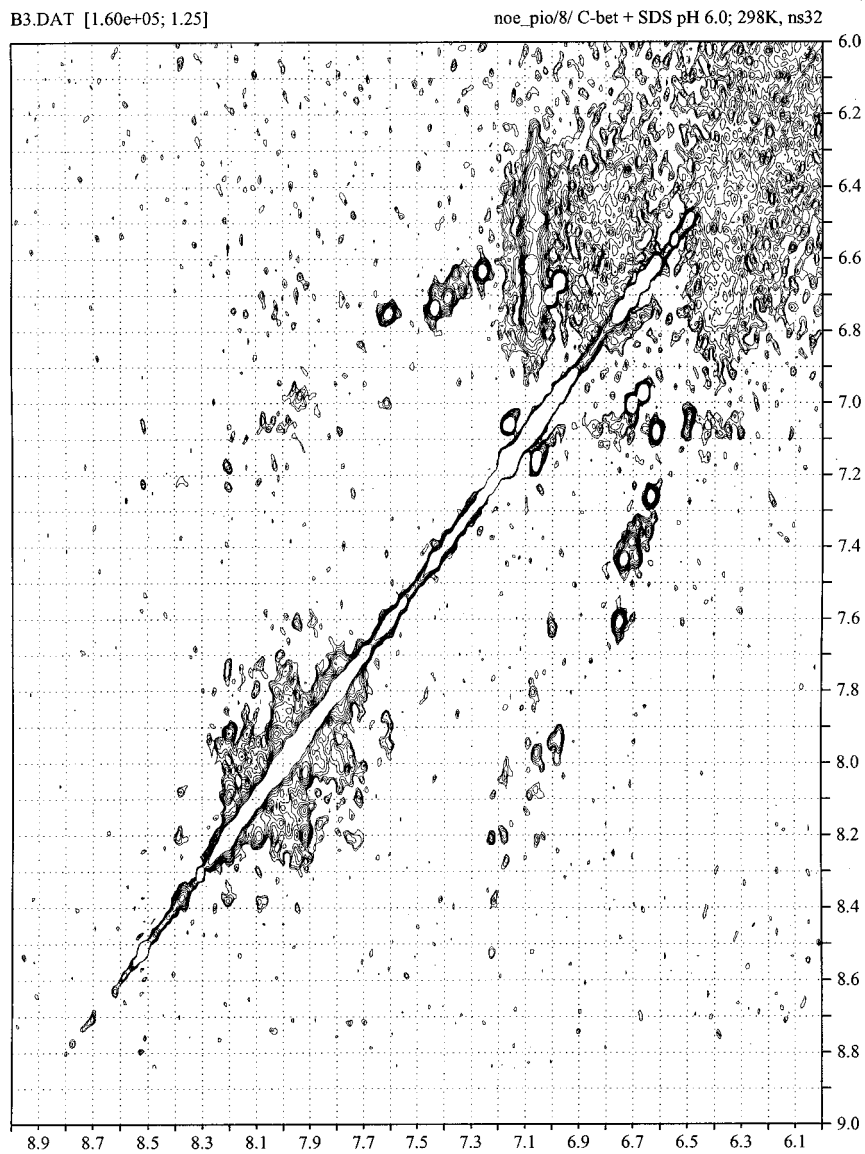


**Abb. 6.7**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Verkürzung C-35 der C-terminalen Domäne von BetP in  $\text{NaP}_i$ -Puffer (10 mM, pH 6) mit DPC (oben) und zusätzlich in Anwesenheit von 300 mM KCl (unten).

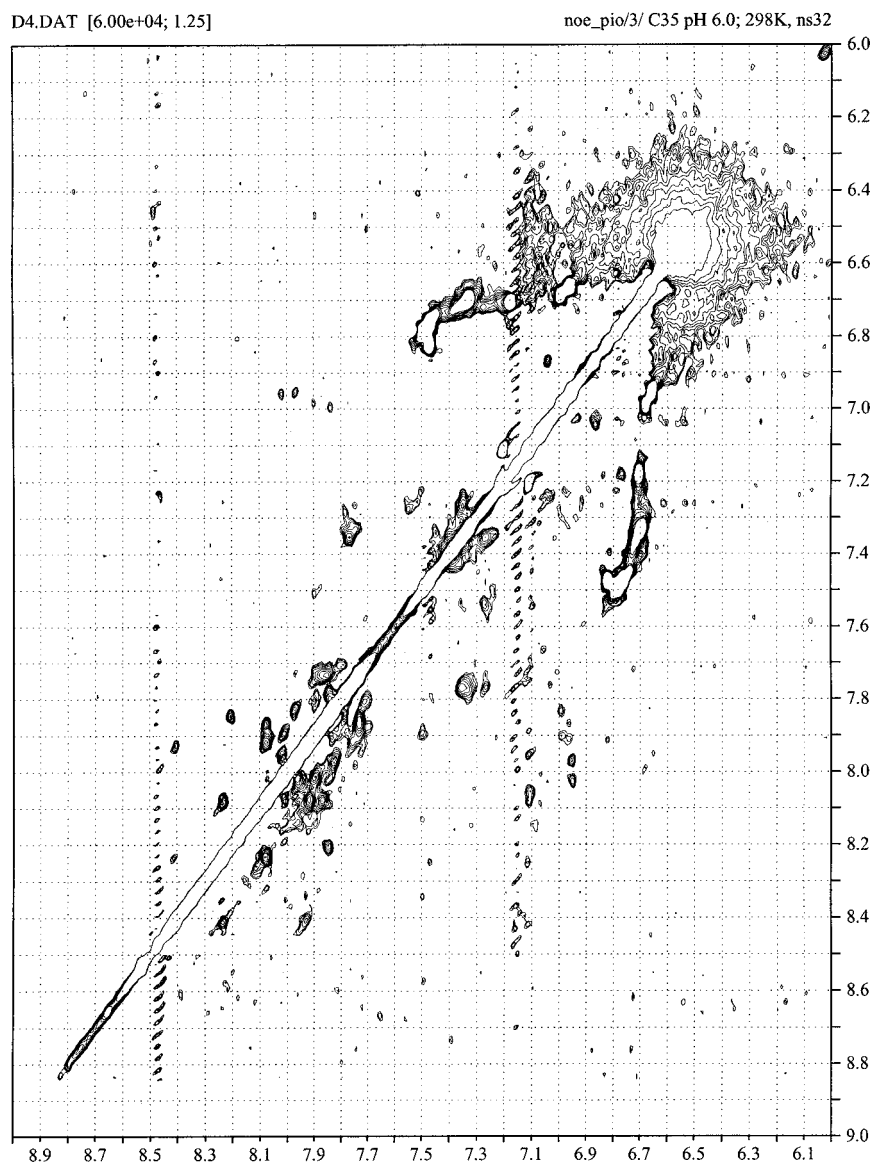
## 6.2 Zweidimensionale NOE- $^1\text{H}$ -NMR-Spektren



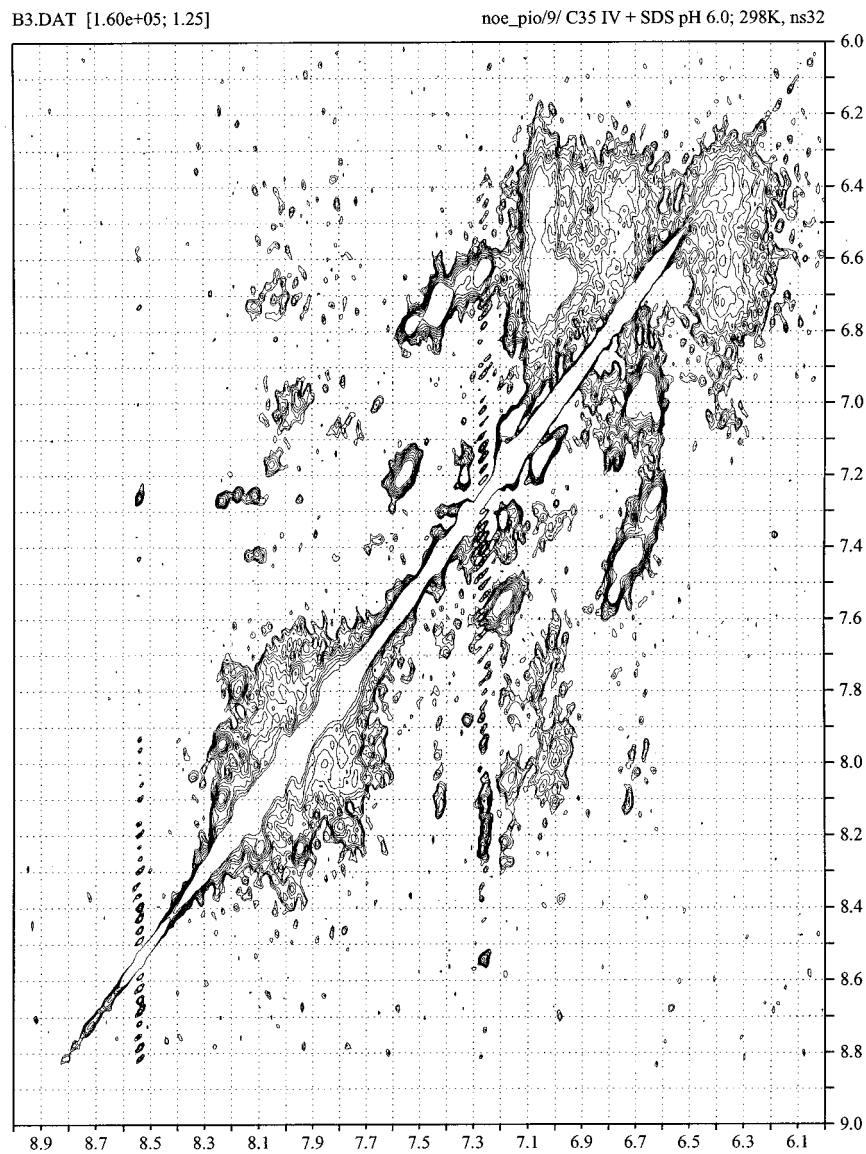
**Abb. 6.8** 2D-NOE- $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der C-terminalen Domäne von BetP in  $\text{NaP}_i$ -Puffer (10 mM, pH 6).



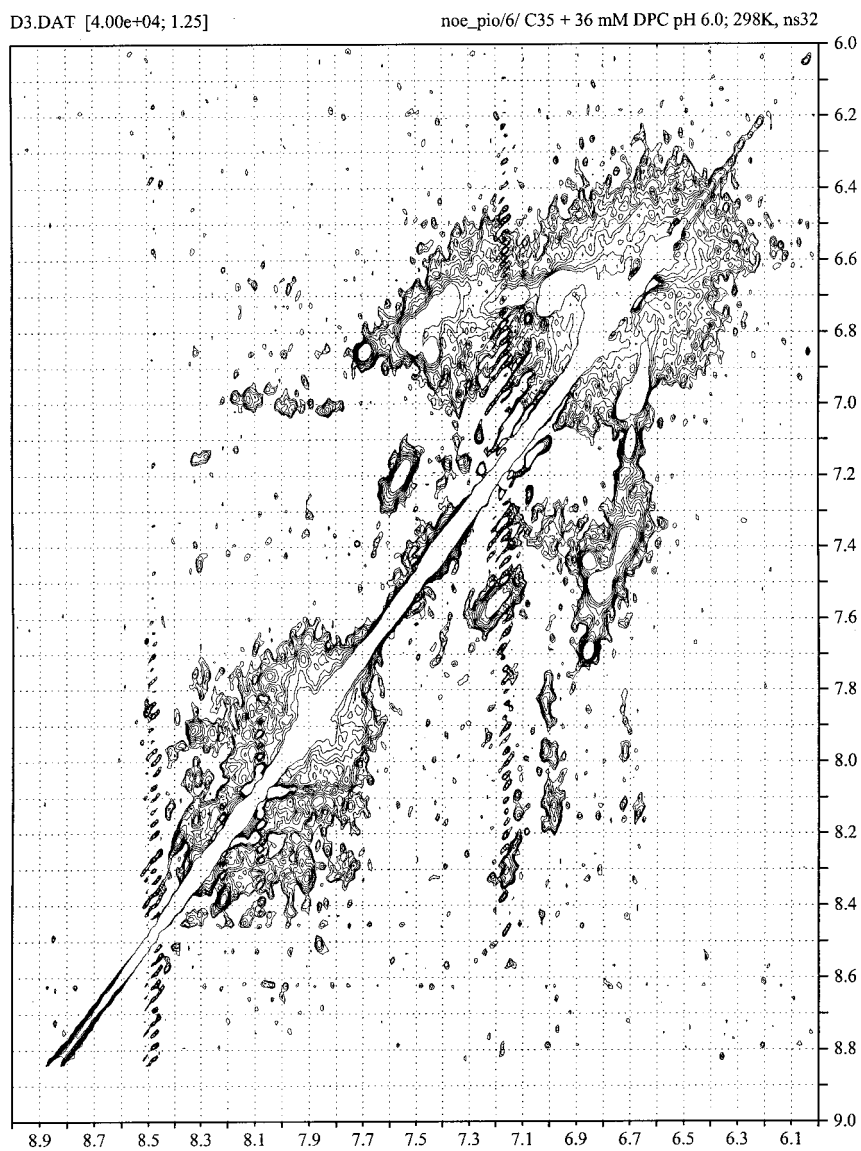
**Abb. 6.9** 2D-NOE- $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der C-terminalen Domäne von BetP in  $\text{NaPi}_i^-$ -Puffer (10 mM, pH 6) mit SDS.



**Abb. 6.10** 2D-NOE- $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Verkürzung C-35 der C-terminalen Domäne von BetP in  $\text{NaPi}$ -Puffer (10 mM, pH 6).

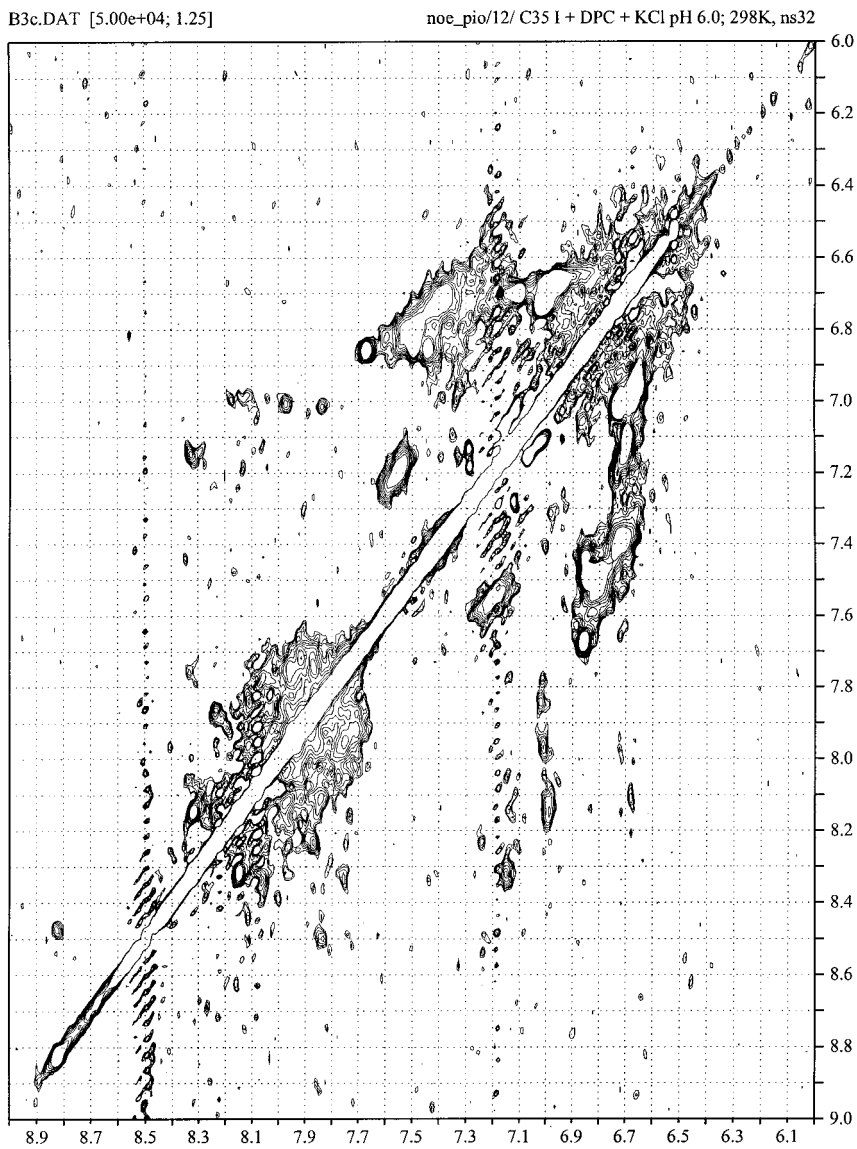


**Abb. 6.11** 2D-NOE- $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Verkürzung C-35 der C-terminalen Domäne von BetP in  $\text{NaP}_i$ -Puffer (10 mM, pH 6) und SDS.



**Abb. 6.12** 2D-NOE-<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der Verkürzung C-35 der C-terminalen Domäne von BetP in Anwesenheit von DPC (36 mM) in NaPi-Puffer (10 mM, pH 6).





**Abb. 6.13** 2D-NOE-<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der Verkürzung C-35 der C-terminalen Domäne von BetP in Anwesenheit von DPC (36 mM) und 300 mM KCl in NaPi-Puffer (10 mM, pH 6).

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- Alex, L.A., Simon, M.I. (1994).** Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *Trends Genet.*, **10**, 133-138.
- Andrade, M.A., Chacón, P., Merelo, J.J., Morán, F. (1993).** Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Prot. Engineering*, **6**, 383-390.
- Bax, A. (1989).** Two-dimensional NMR and protein structure. *Annu. Rev. Biochem.*, **58**, 223-256.
- Beck, K., Gambée, J.E., Bohan, C.A., Bächlinger, H.P. (1997).** The C-terminal domain of cartilage matrix protein assembles into a triple-stranded  $\alpha$ -helical coiled-coil structure. *J. Mol. Biol.*, **256**, 909-923.
- Berrier, C., Coulombe, A., Szabo, I., Zoratti, M., Ghazi, A. (1992).** Gadolinium ion inhibits loss of metabolites induced by osmotic shock and large stretch-activated channels in bacteria. *Eur. J. Biochem.*, **206**, 559-565.
- Berrier, C., Besnard, M., Ajouz, B., Coulombe, A., Ghazi, A. (1996).** Multiple mechanosensitive ion channels from *Escherichia coli*, activated at different thresholds of applied pressure. *J. Membr. Biol.*, **151(2)**, 175-187.
- Birnboim, H.C., Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513-1537.
- 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.
- Bloch, F., Hansen, W.W., Packard, M. (1946).** Nuclear induction. *Phys. Rev.*, **69**, 127.
- Blunden, G., El Baroundi, M.M., Gordon, S.M., McLean, W.F.H., Rogers, D.J. (1981).** Extraction purification and characterisation of Dragendorff-positive compounds from some British marine algae. *Botanica Marina*, **23**, 451-456.
- Booth, I.R., Higgins, C.F. (1990).** Enteric bacteria and osmotic stress: intracellular potassium glutamate as a secondary signal of osmotic stress? *FEMS Microbiol. Rev.*, **6**, 239-246.
- Booth, I.R. (1999).** Adaptation to extreme environments. In: *Biology of the Prokaryotes*, Lengeler, J.W., Drews, G., Schlegel, H.G. (Hrsg.), Thieme-Verlag, 652-671.

- Bremer, E., Krämer, R. (2000).** Coping with osmotic challenges: Osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In: *Bacterial Stress Response*, Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (Hrsg.), ASM, Washington, D.C., 79-97.
- Busch, S.J., Sassone-Corsi, P. (1990).** Dimers, leucine zipers and DNA-binding domains. *Trends in Genetics*, **6**, 36-41.
- Byler, D.M., Susi, H. (1986).** Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers.*, **25(3)**, 469-487.
- Castle, A.M., Macnab, R.M., Shulman, R.G. (1986).** Measurement of intracellular sodium concentration and sodium transport in *Escherichia coli* by  $^{23}\text{Na}$  nuclear magnetic resonance. *J. Biol. Chem.*, **261(7)**, 3288-3294.
- Cayley, S., Lewis, B.A., Guttman, H.J., 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.
- Cayley, S., Guttman, H.J., Record, M.T. Jr. (2000).** Biophysical characterization of changes in amounts and activity of *Escherichia coli* cell and compartment water and turgor pressure in response to osmotic stress. *Biophys. J.*, **78**, 1748-1764.
- Chen, Y.-H., Yang, J.T., Martinez, H.M. (1972).** Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion. *Biochem.*, **11**, 4120-4131.
- Chong, S., Mersha, F.B., Comb, D.G., Scott, M.E., Landry, D., Vence, L.M., Perler, F.B., Benner, J., Kucera, R.B., Hirvonen, C.A., Pelletier, J.J., Paulus, H. and Xu, M.-Q. (1997).** Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene*, **192**, 277-281.
- Chong, S., Montello, G.E., Zhang, A., Cantor, E.J., Liao, W., Xu, M.-Q., Benner, J. (1998).** Utilizing the C-terminal cleavage activity of a protein splicing element to purify recombinant proteins in a single chromatographic step. *Nucl. Acids Res.*, **26**, 5109-5115.
- Collins, K.D., Washabaugh, M.W. (1985).** The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces. *Q. Rev. Biophys.*, **18(4)**, 323-422.
- Csonka, L.N. (1989).** Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.*, **53(1)**, 121-147.
- Culham, D.E., Tripet, B., Racher, K.I., Voegelé, R.T., Hodges, R.S., Wood, J.M. (2000).** The role of the carboxyl terminal alpha-helical coiled-coil domain in osmosensing by transporter ProP of *Escherichia coli*. *J. Mol. Recognit.*, **13(5)**, 309-322.

- Cush, R., Cronin, J.M., Stewart, W.J., Maule, C.H., Molloy, J., Goddard, N.J. (1993).** The resonant mirror: a novel optical biosensor for direct sensing of biomolecular interactions. Part I: Principle of operation and associated instrumentation. *Biosensors and Bioelectronics*, **8**, 347-353.
- Della-Penna, D., Christoffersen, R.E., Bennett, A.B. (1986).** Biotinylated proteins as molecular weight standards on Western blots. *Anal. Biochem.*, **152(2)**, 329-32.
- Demple, B. (1991).** Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Annu. Rev. Genet.*, **25**, 315-339.
- Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmid, R., Backer, E.P. (1988).** Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of potassium of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch. Microbiol.*, **150**, 348-357.
- Evans, T.C., Benner, J., and Xu, M.-Q (1998).** Semisynthesis of cytotoxic proteins using a modified protein splicing element. *Protein Science*, **7**, 2256-2264.
- Eggeling, L., Morbach, S., Sahm, H. (1997).** The fruits of molecular physiology: engineering the L-isoleucine biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.*, **56**, 167-182.
- Eggeling, L., Sahm, H. (2001).** The cell wall barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux. *J. Biosc. Bioeng.*, **92(3)**, 201-213.
- Farwick, M., Siewe, R.M., Krämer, R. (1995).** Glycine betaine uptake after hyperosmotic shift in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.*, **177**, 4690-4695.
- Fendler, K., Dröse, S., Altendorf, K., Bamberg, E. (1996).** Electrogenic K<sup>+</sup> Transport by the KdpATPase of *Escherichia coli*. *Biochem.*, **35**, 8009-8017.
- Frings, E., Kunte, H.J., Galinski, E.A. (1993).** Compatible solutes in representatives of the genera *Brevibacterium* and *Corynebacterium*: occurrence of tetrahydropyrimidines and glutamine. *FEMS Microbiol. Lett.*, **109**, 25-32.
- Galinski, E.A., Trüper, H.G. (1994).** Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.*, **15**, 95-108.
- Gans, P.L., Lyu, P.C., Manning, M.C., Woody, R.W., Kallenbach, N.R. (1991).** The helix-coil transition in heterogeneous peptides with specific side-chain interactions: Theory and comparison with CD spectral data. *Biopolymers*, **31**, 1605-1614.
- Garner, M.M., Burg, M.B. (1994).** Macromolecular crowding and confinement in cells exposed to hypertonicity. *Am. J. Physiol.*, **266**, C877-C892.

- Goormaghtigh, E., Cabiliaux, V., Ruyschaert, J.M. (1994a).** Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. II. Experimental aspects, side chain structure, and H/D exchange. *Subcell. Biochem.*, **23**, 329-362.
- Goormaghtigh, E., Cabiliaux, V., Ruyschaert, J.M. (1994b).** Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures. *Subcell. Biochem.*, **23**, 405-450.
- Goesbet, G., Trautwetter, A., Bonnassie, S., Wu, L.F., Blanco, C. (1996).** Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* osmoprotectant transporter gene *ousA*. *J. Bacteriol.*, **178(2)**, 447-55.
- Greenfield, N.J. (1996).** Methods to estimate the conformation from circular dichroism data. *Analyt. Biochem.*, **235**, 1-10.
- Guillouet, S., Engasser, J.M. (1995a).** Sodium and proline accumulation in *Corynebacterium glutamicum* as a response to an osmotic saline upshock. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **43**, 315-320.
- Guillouet, S., Engasser, J.M. (1995b).** Growth of *Corynebacterium glutamicum* in glucose-limited continuous cultures under high osmotic pressure. Influence of growth rate on the intracellular accumulation of proline, glutamate and trehalose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**, 496-500.
- Guillouet, S., Engasser, J.M. (1996).** Kinetics of volume of *Corynebacterium glutamicum* following saline osmotic upshifts. *Biotechnol. Lett.*, **18(2)**, 145-148.
- Hecker, M., Schumann, W., Völker, U. (1996).** Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, **19**, 417-428.
- Heermann, R., Altendorf, K., Jung, K. (2000).** The hydrophilic N-terminal domain complements the membrane-anchored C-terminal domain of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **275(22)**, 17080-17085.
- Higgins, C.F., Cairney, J., Stirling, D.A., Sutherland, L., Booth, I.R. (1987).** Osmotic regulation of gene expression: ionic strength as an intracellular signal? *TIBS*, **12**, 339-344.
- Ho, C.-Y., Adamson, J.G., Hodges, R.S., Smith, M. (1994).** Heterodimerization of the yeast MATa1 and MAT alpha 2 proteins is mediated by two leucine zipper-like coiled-coil motifs. *EMBO J.*, **13**, 1403-1413.

- Hoischen, C., Krämer, R. (1990).** Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **172(6)**, 3409-3416.
- Huang, E.S., Samudrala, R., Ponder, J.W. (1999).** Ab initio fold prediction of small helical proteins using distance geometry and knowledge-based scoring functions. *J. Mol. Biol.*, **290(1)**, 267-281.
- Imamura, A., Hanaki, N., Umeda, H., Nakamura, A., Suzuki, T., Ueguchi, C., Mizuno, T. (1998).** Response regulators implicated in His-to-Asp phosphotransfer signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **95(5)**, 2691-2696.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990).** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96(1)**, 23-28.
- Ionescu, R.M., Matthews, C.R. (1999).** Folding under the influence. *Nat. Struct. Biol.*, **6(4)**, 304-307.
- Jasanoff, A., Fersht, A.R. (1994).** Quantitative determination of helical propensities from trifluoroethanol titration curves. *Biochem.*, **33(8)**, 2129-2135.
- Jung, K., Hamann, K., Revermann, A. (2001).** K<sup>+</sup> stimulates specifically the autokinase activity of purified and reconstituted EnvZ of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, in press.
- Jung, K., Krabusch, M., Altendorf, K. (2001).** Cs<sup>+</sup> induces the *kdp* operon of *Escherichia coli* by lowering the intracellular K<sup>+</sup> concentration. *J. Bacteriol.*, **183(12)**, 3800-3803.
- Jung, K., Tjaden, B., Altendorf, K. (1997).** Purification, reconstitution, and characterization of KdpD, the turgor sensor of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **272(16)**, 10847-10852.
- Jung, K., Veen, M., Altendorf, K. (2000).** K<sup>+</sup> and ionic strength directly influence the autophosphorylation activity of the putative turgor sensor KdpD of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **275(51)**, 40142-40147.
- Kawahara, Y., Ohsumi, T., Yoshihara, Y., Ikeda, S. (1989).** Proline in the osmoregulation of *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2475-2479.
- Kawahara, Y., Yoshihara, Y., Ikeda, S., Hirose, Y. (1990).** Effect of glycine betaine, an osmoprotective compound on the growth of *Brevibacterium lactofermentum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 574-577.
- Keilhauer, C., Eggeling, L., Sahm, H. (1993).** Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC*-operon. *J. Bacteriol.*, **175**, 5595-5603.
- Kempf, B., Bremer, E. (1998).** Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.*, **170**, 319-330.

- Kinoshita, S., Ukada, S., Shimono, M. (1957).** Studies on the amino acid fermentation: I. Production of L-Glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **3**, 193-205.
- Koch, A. (1984).** Shrinkage of growing *Escherichia coli* cells by osmotic challenge. *J. Bacteriol.*, **159(3)**, 919-924.
- Krämer, R., Lambert, C., Hoischen, C., Ebbinghausen, H. (1990).** Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. 1. Kinetic properties and regulation by internal pH and potassium. *Eur. J. Biochem.*, **194**, 929-935.
- Krämer, R. (1994).** Functional principles of solute transport systems: concepts and perspectives. *Biochim. Biophys. Acta*, **1185**, 1-34.
- Lämmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Landfald, B., Strøm, A.R. (1986).** Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **165**, 849-855.
- Lau, S.Y.M., Taneja, A.K., Hodges, R.S. (1984).** Effects of high-performance liquid chromatographic solvents and hydrophobic matrices on the secondary and quaternary structure of a model protein. *J. Chromatog.*, **317**, 129-140.
- Leuchtenberger, W. (1996).** Amino acids - technical production and use. In: *Products of Primary Metabolism*, Rehm, H.J., Reed, G. (Hrsg.), *Biotechnology*, **6**, 455-502.
- Liebl, W. (1991).** The genus *Corynebacterium* - nonmedical. In: *The Prokaryotes*, vol. II, Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (Hrsg.), New York, 1157-1171.
- Liebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1991).** Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297<sup>T</sup>, *Brevibacterium flavum* DSM 20411, *Brevibacterium lactofermentum* DSM 20412 and DSM 1412 and *Corynebacterium lilium* DSM 20137<sup>T</sup> to *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns. *J. Syst. Bacteriol.*, **41**, 255-260.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M., Saito, H. (1994).** A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, **369(6477)**, 242-245.
- Marsh, D. (1996).** Lateral pressure in membranes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1286(3)**, 183-223.
- Martin, D.D., Ciulla, R.A., Roberts, M.F. (1999).** Osmoadaptation in archaea. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65(5)**, 1815-1825.

- Martinac, B., Adler, J., Kung, C. (1990).** Mechanosensitive ion channels of *E. coli* activated by amphipaths. *Nature*, **15**, 261-263.
- Mayo, K.H., De Marco, A., Menegatti, E., Kaptein, R. (1987).** Interaction of epidermal growth factor with micelles monitored by photochemically induced dynamic nuclear polarization-<sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, **262(31)**, 14899-14904.
- McLaggan, D., Logan, T.M., Lynn, D.G., Epstein, W. (1990).** Involvement of gamma-glutamyl peptides in osmoadaptation of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **172(7)**, 3631-3636.
- McLaggan, D., Naprstek, J., Buurman, E.T., Epstein, W. (1994).** Interdependence of K<sup>+</sup> and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **269**, 1911-1917.
- Measures, J.C. (1975).** Role of amino acids in osmoregulation in non-halophilic bacteria. *Nature*, **348**, 261-263.
- Meyboom, A., Maretzki, D., Stevens, P.A., Hofmann, K.P. (1999).** Interaction of pulmonary surfactant protein A with phospholipid liposomes: a kinetic study on head group and fatty acid specificity. *Biochim. Biophys. Acta.*, **41(1)**, 23-35.
- Montserret, R., McLeish, M.J., Böckmann, A., Geourjon, C., Penin, F. (2000).** Involvement of electrostatic interactions in the mechanism of peptide folding induced by sodium dodecyl sulfate binding. *Biochem.*, **39(29)**, 8362-8373.
- Najbar, L.V., Craik, D.J., Wade, J.D., Salvatore, D., McLeish, M.J. (1997).** Conformational analysis of LYS(11-36), a peptide derived from the beta-sheet region of T4 lysozyme, in TFE and SDS. *Biochem.*, **36(38)**, 11525-11533.
- Nottebrock, D. (2000).** Mechanosensitive Kanäle in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Oas, T.G., Endow, S.A. (1994).** Springs and hinges: dynamic coiled-coils and discontinuities. *Trends in Biochem. Sci.*, **19**, 51-54.
- Parsegian, V.A., Rand, R.P., Rau, D.C. (1995).** Macromolecules and water: probing with osmotic stress. *Methods Enzymol.*, **259**, 43-94.
- Paulsen, I.T., Sliwinski, M.K., Saier, M.H. Jr. (1998).** Microbiol genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. *J. Mol. Biol.*, **277**, 573-592.
- Peter, H. (1997).** Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Aufnahme von osmoprotektiven Substanzen bei *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation der Universität Düsseldorf. *Berichte des Forschungszentrums Jülich*, 3460.



- Peter, H., Burkovski, A., Krämer, R. (1996).** Isolation, characterization, and expression of the *Corynebacterium glutamicum betP* gene, encoding the transport system for the compatible solute glycine betaine. *J. Bacteriol.*, **178**, 5229-5234.
- Peter, H., Burkovski, A., Krämer, R. (1998a).** Osmo-sensing by N- and C-terminal extensions of the glycine betaine uptake system BetP of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.*, **273**, 2567-2574.
- Peter, H., Weil, B., Burkovski, A., Krämer, R., Morbach, S. (1998b).** *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers of compatible solutes: identification, sequencing, and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP. *J. Bacteriol.*, **180(22)**, 6005-6012.
- Poolman, B., Glaasker, E. (1998).** Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol.*, **29(2)**, 397-407.
- Prasad, R. (1996).** Manual on Membrane Lipids, Springer-Verlag, Heidelberg.
- Provencher, S.W., Glöckner, J. (1981).** Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochem.*, **20**, 33-37.
- Qin, L., Yoshida, T., 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(3)**, 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., Hallett, F.R. (1999).** Purification and reconstitution of an osmosensor: transporter ProP of *Escherichia coli* senses and responds to osmotic shifts. *Biochem.*, **38(6)**, 1676-1684.
- Racher, K.I., Culham, D.E., Wood, J.M. (2001).** Requirements for osmosensing and osmotic activation of transporter ProP from *Escherichia coli*. *Biochem.*, **40(24)**, 7324-7333.
- Record, M.T.Jr., Courtenay, E.S., Cayley, S., Guttman, H.J. (1998a).** Responses of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. *TIBS*, **23**, 143-148.
- Record, M.T.Jr., Courtenay, E.S., Cayley, S., Guttman, H.J. (1998b).** Biophysical compensation mechanism buffering *E. coli* protein-nucleic acid interactions against changing environments. *TIBS*, **23**, 190-194.
- Reizer, J., Reizer, A., Saier, M.H. (1994).** A functional superfamily of sodium/solute symporters. *Biochim. Biophys. Act.*, **1197**, 133-166.

- Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J.M., Hohmann, S. (2000).** The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. *J. Biol. Chem.*, **275(12)**, 8290-8300.
- Reynolds, J.A., Tanford, C. (1970).** The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. *J. Biol. Chem.*, **245(19)**, 5161-5165.
- Richey, B., Cayley, D.S., Mossing, M.C., Kolka, C., Anderson, C.F., Farrar, T.C., Record, M.T. Jr. (1987).** Variability of the intracellular ionic environment of *Escherichia coli*. Differences between in vitro and in vivo effects of ion concentrations on protein-DNA interactions and gene expression. *J. Biol. Chem.*, **262(15)**, 7157-7164.
- Rigaud, J.L., Pitard, B., Levy, D. (1995).** Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1231(3)**, 223-46.
- Rönsch, H. (2000).** Untersuchungen zum Einfluß der Osmoregulation auf die Aminosäureproduktion mit *Corynebacterium glutamicum*. *Dissertation*, Universität zu Köln.
- Rottenberg, H. (1979).** The measurement of membrane potential and  $\Delta$ pH in cells, organelles, and vesicles. *Meth. Enzymol.*, **55**, 547-569.
- Rübenhagen, R., Rönsch, H., Jung, H., Krämer, R., Morbach, S. (2000).** Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes. *J. Biol. Chem.*, **275(2)**, 735-741.
- Rübenhagen, R., Morbach, S., Krämer, R. (2001).** The osmoreactive betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* is a sensor for cytoplasmic K<sup>+</sup>. *EMBO J.*, **20(19)**, 5412-5420.
- Rübenhagen, R. (2001).** Der Glycinbetain-Transporter BetP aus *Corynebacterium glutamicum* als Osmosensor. *Dissertation*, Universität zu Köln.
- Ruffert, S., Berrier, C., Krämer, R., Ghazi, A. (1999).** Identification of mechanosensitive ion channels in the cytoplasmic membrane of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.*, **181(5)**, 1673-1676.
- Saier, M.H. Jr. (1994).** Computer-aided analyses of transport protein sequences: gleanings concerning function, structure, biogenesis, and evolution. *Microbiol. Rev.*, **58(1)**, 71-93.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schleyer, M., Schmid, R., Bakker, E.P. (1993).** Transient, specific and extremely rapid release of osmolytes from growing cells of *Escherichia coli* K-12 exposed to hypoosmotic shock. *Arch. Microbiol.*, **160(6)**, 424-431.

- Schnatzke, G. (1981).** Chiroptische Methoden in der Stereochemie. *Chemie in unserer Zeit*, **15(3)**, 78-87, 160-168.
- Schuster, R. (1988).** Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. *J. Chrom.*, **431(2)**, 271-284.
- Seifert, K., Fendler, K., Bamberg, E. (1993).** Charge transport by ion translocation membrane proteins on solid supported membranes. *Biophys. J.*, **64**, 384-391.
- Siderius, M., Kolen, C.P.A.M., van Heerikhuizen, H., Mager, W.H. (2000).** Candidate osmosensos from *Candida utilis* and *Kluyveromyces lactis*: structural and functional homology to the Sho1p putative osmosensor from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1517**, 143-147.
- Skjerdal, O.T., Sletta, H., Flenstad, S.G., Josefsen, K.D., Levine, D.W., Ellingsen, T.E. (1995).** Changes in cell volume, growth and respiration rate in response to hyperosmotic stress of NaCl, sucrose and glutamic acid in *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **43**, 1099-1106.
- Skjerdal, O.T., Sletta, H., Flenstad, S.G., Josefsen, K.D., Levine, D.W., Ellingsen, T.E. (1996).** Changes in intracellular composition in response to hyperosmotic stress of NaCl, sucrose or glutamic acid in *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**, 635-642.
- Sonnichsen, F.D., Van Eyck, J.E., Hodges, R.S., Sykes, B.D. (1992).** Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: an NMR and CD study using a synthetic actin peptide. *Biochem.*, **31**, 8790-8798.
- Sreerama, N., Woody, R.W. (1993).** A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure form circular dichroism. *Analyt. Biochem.*, **209**, 32-44.
- Stock, J.B., Rauch, B., Roseman, S. (1977).** Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **252**, 7850-7861.
- Sukharev, S., Betanzos, M., Chiang, C.S., Guy, H.R. (2001).** The gating mechanism of the large mechanosensitive channel MscL. *Nature*, **409(6821)**, 720-724.
- Susi, H., Byler, D.M., Purcell, J.M. (1985).** Estimation of beta-structure content of proteins by means of deconvolved FTIR spectra. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **11(4-5)**, 235-240.
- Sutherland, L., Cairney, J., Elmore, M.J., Booth, I.R., Higgins, C.F. (1887).** Osmotic regulation of transcription: induction of the *proU* betaine transport gene is dependent on accumulation of intracellular potassium. *J. Bacteriol.*, **168**, 805-814.

- Tanaka, T., Saha, S.K., Tomomori, C., Ishima, R., Liu, D., Tong, K.I., Park, H., Dutta, R., Qin, L., Swindells, M.B., Yamazaki, T., Ono, A.M., Kainosho, M., Inouye, M., Ikura, M. (1998). NMR structure of the histidine kinase domain of the *E. coli* osmosensor EnvZ. *Nature*, **396(6706)**, 88-92.
- Timasheff, S.N. (1992). Water as ligand: preferential binding and exclusion of denaturants in protein unfolding. *Biochem.*, **31(41)**, 9857-9864.
- Tomomori, C., Tanaka, T., Dutta, R., Park, H., Saha, S.K., Zhu, Y., Ishima, R., Liu, D., Tong, K.I., Kurokawa, H., Qian, H., Inouye, M., Ikura, M. (1999). Solution structure of the homodimeric core domain of *Escherichia coli* histidine kinase EnvZ. *Nat. Struct. Biol.*, **6(8)**, 729-734.
- Torres, J., Padros, E. (1995). Spectroscopic studies of bacteriorhodopsin fragments dissolved in organic solution. *Biophys. J.*, **68(5)**, 2049-2055.
- Trchounian, A., Kobayashi, H. (1999). Kup is the major K<sup>+</sup> uptake system in *Escherichia coli* upon hyper-osmotic stress at a low pH. *FEBS Lett.*, **447(2-3)**, 144-148.
- van der Heide, T., Poolman, B. (2000). Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97(13)**, 7102-7106.
- von Blohn, C., Kempf, B., Kappes, R.M., Bremer, E. (1997). Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. *Mol. Microbiol.*, **25**, 175-187.
- Wagner, G, Wüthrich, K. (1982). Sequential resonance assignments in protein <sup>1</sup>H NMR spectra: basic pancreatic trypsin inhibitor. *J. Mol. Biol.*, **155**, 347-366.
- Wagner, G. (1997). An account of NMR in structural biology. *Nature Struct. Biol.*, **4**, 841-844.
- Wegmann, K. (1986). Osmoregulation in eukaryotic algae. *FEMS Microbiol. Rev.*, **39**, 37-43.
- Whatmore, A., Reed, R.H. (1990). Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K<sup>+</sup> in turgor regulation. *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 2521-2526.
- Whatmore, A., Chudek, J.A., Reed, R.H. (1990). The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 2527-2535.
- Williams, K.A., (2000). Three-dimensional structure of the ion-coupled transport protein NhaA. *Nature*, **403**, 112-115.
- Wood, J.M. (1999). Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63(1)**, 230-262.

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

**Zhou, N.E., Monera, O.D., Kay, C.M., Hodges, R.S. (1994).**  $\alpha$ -helical propensities of amino acids in the hydrophobic face of an amphiphathic  $\alpha$ -helix. *Protein Pept. Lett.*, **1**, 114-119.

---

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer danke ich für die Überlassung des Themas, die engagierte Betreuung und den intensiven wissenschaftlichen Austausch während der Arbeit.

Bei meiner Betreuerin und Gruppenleiterin der Osmogruppe Dr. Susanne Morbach möchte ich mich recht herzlich für die Diskussionen und Anregungen während der Arbeit bedanken.

Wichtige und vor allem sehr erheiternde Diskussionen in der Mittagszeit, beim Kaffeetrinken und während der Arbeit haben nicht nur die Arbeitsatmosphäre positiv beeinflusst, sondern auch verwertbare wissenschaftliche Diskussionen angeregt. Dabei gilt der besondere Dank den Mitgliedern der Osmogruppe, bestehend aus: Johannes Botzenhardt, Oliver Ley, Ute Meyer, Dirk Schiller, Ralf Steger, Martin Weinand, Andreas Wolf, und nicht zuletzt Eva Gleys, die viel Arbeit bei der Proteinreinigung hatte. Sie war eine große Hilfe für mich. Vielen Dank an die übrigen momentanen und ehemaligen Abteilungsmitglieder und die technischen Mitarbeiter die mich in den letzten drei Jahren begleitet haben, für die nette Doktorandenzeit.

Folgenden Kooperationspartnern danke ich vielmals für ihren Einsatz und die getätigten Untersuchungen:

In der Abteilung Grzesiek in Basel wurden durch Hans-Jürgen Sass die NMR-Untersuchungen durchgeführt. In der Abteilung Schomburg (Köln) konnte ich CD- und Dynamische Lichtstreuungs-Messungen machen. Dank der Abteilung Bamberg (Frankfurt) war es möglich bei Dr. Klaus Fendler BetP an festkörpergestützten Membranen zu untersuchen. IR-Spektroskopie wurde schließlich bei Herrn Dr. Heberle in Jülich durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Sterner danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

---

## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt habe, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und diejenigen Stellen der Arbeit (einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen), die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe. Diese Dissertation hat noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen; sie wurde - abgesehen von den unten aufgeführten Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht und eine solche Veröffentlichung wird vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vorgenommen werden.

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

Datum:

Unterschrift:

---

## Lebenslauf

Name Udo Burger  
Anschrift Ferdinandstr. 74, 53127 Bonn  
Geburtsdatum 16. Dezember 1969  
Geburtsort 51789 Lindlar  
Konfession römisch-katholisch  
Familienstand verheiratet, zwei Kinder

### Schulbildung

1976-1980 Kath. Grundschule Lindlar  
1980-1989 St. Angela-Gymnasium Wipperfürth, Abitur  
  
1989-1990 Zivildienst in der Alten- und Behindertenbetreuung, Caritas in Lindlar

### Studium

10/1990 - 02/1999 Studium der Chemie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
08/1998 - 02/1999 Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Universität zu Köln unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. R. Krämer  
11/1991 - 10/1997 Studium der Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
01/1997 - 10/1997 Diplomarbeit am Institut für Biotechnologie II des Forschungszentrums Jülich unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. H. Sahn  
02/1999 - 02/2002 Doktorand am Institut für Biochemie der Universität zu Köln

### Stipendien

Stipendium des Graduiertenkollegs „Molekulare Physiologie: Stoff- und Energieumwandlung“ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf