

Regulation des Betaintransporters BetP aus *Corynebacterium glutamicum* während der Anpassung an hyperosmotischen Stress

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

vorgelegt von

Johannes Botzenhardt
aus Dallas

Köln, Mai 2004

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Krämer
Prof. Dr. U.-I. Flügge

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 2004

KURZZUSAMMENFASSUNG

Das Betainaufnahmesystem BetP aus *Corynebacterium glutamicum* ist ein osmotisch regulierter sekundärer Transporter für das kompatible Solut Betain. Die Aktivierung solcher Transporter nach einem hyperosmotischen Schock stellt einen zentralen Teil der bakteriellen Antwort auf hyperosmotischen Stress dar. Da je nach Ausmaß des Stresses unterschiedliche interne Konzentrationen kompatibler Solute eingestellt werden müssen, ist auch die rechtzeitige Beendigung der Akkumulation dieser Substanzen durch die Abschaltung der Synthese- und Transportsysteme oder die Aktivierung von Exportern ein unverzichtbarer Bestandteil dieser Antwort. Während die Aktivierung der Transporter als unmittelbare Reaktion auf osmotischen Stress bereits seit Jahren systematisch erforscht wird, wurde in dieser Arbeit erstmals die Regulation eines Transporters für kompatible Solute während der Adaptation an hyperosmotischen Stress ausführlich untersucht. Dazu wurde *betP* in Zellen exprimiert, in denen die Gene für alle bekannten Transporter kompatibler Solute deletiert worden waren. Die Betainaufnahme durch BetP oder eine hinsichtlich der Antwort auf osmotischen Stress deregulierte Mutante wurde in verschiedenen Phasen der Antwort auf osmotischen Stress untersucht und nach unidirektionalem Import, unidirektionalem Export und Nettoimport aufgeteilt. Während der Adaptationsphase wurde ein stark verlangsamter Nettoimport von Betain beobachtet, was auf eine Abnahme der Importgeschwindigkeit von BetP und signifikante Gegentauschaktivität des Transporters zurückgeführt werden konnte. Die Beteiligung von separaten Effluxsystemen konnte ausgeschlossen werden. Die Regulation von BetP beim Eintritt in die Adaptationsphase ist von Änderungen der cytoplasmatischen Kaliumionenkonzentration unabhängig und unterscheidet sich daher von der Regulation der Aktivierung. Eine Inhibition durch intern akkumuliertes Substrat, wie sie für andere Transporter kompatibler Solute beschrieben wurde, ist ebenfalls nicht verantwortlich für die Adaptationsregulation von BetP. Aufgrund der Ergebnisse wird vermutet, dass als zweiter regulatorischer Stimulus ein osmotisch relevanter Parameter direkt von BetP wahrgenommen wird. Mögliche Kandidaten sind hierbei der Hydratationsstatus des Proteins sowie Änderungen bei den Protein-Membran-Wechselwirkungen.

ABSTRACT

The betaine uptake system BetP of *Corynebacterium glutamicum* is an osmotically regulated secondary transporter for the compatible solute betaine. The activation of such transporters is an essential part of the bacterial response to hyperosmotic stress. To ensure adequate internal concentrations of compatible solutes in dependency on the extent of osmotic stress, the downregulation of synthesis and import systems or the activation of exporters must be included in this response. While the activation of transporters as the initial response to hyperosmotic stress has been subject of research since many years, this is the first study extensively elucidating the regulation of a compatible solute transporter during the adaptation to hyperosmotic stress. The *betP* gene was expressed in cells lacking all known transporters for compatible solutes. In different phases of the osmotic stress response, betaine uptake mediated by BetP as well as by a mutant which is deregulated in its response to hyperosmotic stress was monitored and dissected into fluxes of unidirectional uptake, unidirectional efflux and net uptake. In the adaptation phase, a downregulation of betaine net import was observed which was due to a decrease of net import by BetP as well as significant counter-exchange activity of the transporter. The participation of a separate export system could be excluded. The regulation of BetP which leads to the adaptation phenomenon is independent of the cytoplasmic potassium ion concentration and for that differs from the regulation of activation of BetP. Feedback inhibition, postulated for other compatible solute transporters, is not part of BetP regulation. We suggest that the second regulatory stimulus is an osmotically relevant parameter such as the hydration status of the protein or changes in protein-membrane interactions and is sensed directly by BetP.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	1
1.2	Osmotischer Stress.....	1
1.3	Kompatible Solute.....	4
1.4	Import kompatibler Solute.....	5
1.5	Wahrnehmung von osmotischem Stress durch Transporter und deren Regulation....	8
1.6	Adaptationsregulation osmotisch aktivierter Transporter.....	10
1.7	Ziel der Arbeit.....	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Stämme und Plasmide.....	14
2.2	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen.....	14
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	16
2.3.1	Transformation von <i>E. coli</i> MKH13.....	16
2.3.2	Transformation von <i>C. glutamicum</i> DHPF.....	16
2.4	Biochemische Methoden.....	17
2.4.1	Synthese von [¹⁴ C]- und [³ H]-Betain.....	17
2.4.2	Betain-Transportmessungen mit <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	17
2.4.3	Doppelmarkierungsexperimente.....	18
2.4.4	Glutamin-Transportmessungen mit <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	18
2.4.5	Betain-Transportmessungen mit <i>E. coli</i> -Zellen.....	19
2.4.6	Volumenbestimmung von <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	19
2.4.7	Bestimmung interner Solute: Versuchs- und Aufschluss-Bedingungen.....	20
2.4.7.1	Bestimmung der internen Kaliummenge.....	21
2.4.7.2	Bestimmung der internen Betainmenge.....	21
2.4.7.3	Bestimmung der internen Prolinmenge.....	21
2.4.7.4	Bestimmung der internen Trehalosemenge.....	22
3	Ergebnisse	23
3.1	Aufnahme von Betain durch BetP.....	23
3.1.1	Einfluss der Osmolalität auf die Betainaufnahme.....	23
3.1.2	Einfluss des Membranpotenzials.....	26

3.1.3	Aktivität von BetP nach plötzlicher Aufhebung hyperosmotischer Bedingungen27
3.2	BetP-Aktivität und Wachstumsmedium.....	29
3.2.1	Zu Versuchsbeginn vorhandene Menge Betain: Einfluss auf die Gewinnung kinetischer Daten und auf die spezifische Radioaktivität30
3.2.2	Betain-Aufnahme von in BHI kultivierten Zellen32
3.2.3	Äquilibrierung der internen und externen Betainmenge33
3.3	Charakterisierung der Betainflüsse: Import und Export von Betain.....	36
3.4	Regulatorische Stimuli von BetP während der Adaptation.....	39
3.4.1	Rolle von Kalium bei der Regulation von BetP.....	40
3.4.1.1	Kaliumkonzentration und Volumen nach hyperosmotischem Schock: Zellen aus MM1-Medium.....	40
3.4.1.2	Kaliumkonzentration und Volumen nach hyperosmotischem Schock: Zellen aus BHI-Medium.....	42
3.4.2	Akkumulation internen Betains nach hyperosmotischem Schock.....	44
3.4.3	BetP-Aktivität nach Adaptation an hyperosmotischen Stress ohne Möglichkeit der Betainaufnahme46
3.4.4	Betainaufnahme der deregulierten Mutante BetP Δ 25.....	48
3.4.5	Regulation heterolog exprimierten BetP-Proteins in <i>E. coli</i> MKH1352
4	Diskussion	54
4.1	BetP-Aktivität und Natriumpotenzial.....	54
4.2	Betainflüsse, beteiligte Proteine und deren Regulation nach einem hyperosmotischem Schock.....	56
4.3	Einfluss unterschiedlicher Wachstumsbedingungen auf die Adaptation von <i>C. glutamicum</i> an hyperosmotischen Stress.....	59
4.4	Welcher Stimulus führt zur Adaptation ?.....	61
4.4.1	Kaliumionenkonzentration und BetP-Regulation62
4.4.2	Inhibition durch intern akkumuliertes Substrat.....	64
4.4.3	Beteiligung eines weiteren Proteins an der Adaptationsregulation65
4.4.4	Mögliche für die Adaptationsregulation relevante Stimuli.....	66
5	Zusammenfassung	73
6	Literatur	74

Abkürzungen

ABC	ATP-bindende Kasette
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	Hirn-Herz-Bouillon (<i>Brain Heart Infusion</i>)
BTM	Biotrockenmasse
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
HPLC	Hochdruck-Flüssigchromatografie (<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>)
LB	Luria-Bertani
N-Quelle	Stickstoffquelle
NaPi	Puffer aus Natriumhydrogenphosphat und Natriumdihydrogenphosphat
KPi	Puffer aus Kaliumhydrogenphosphat und Kaliumdihydrogenphosphat
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Einleitung

1.1 *Corynebacterium glutamicum*

Corynebacterium glutamicum ist ein Gram-positives, apathogenes Bodenbakterium. Es wurde 1957 von Kinoshita *et al.* als Glutamat-sezernierender Organismus isoliert. Es gehört zur Unterordnung der *Corynebacterineae*, die neben Corynebakterien auch Mykobakterien, Nocardien und Rhodokokken vereint (Stackebrandt *et al.*, 1997). *Corynebakterien* sind aerob und unbeweglich. Sie bilden keine Sporen aus. Der Name *Corynebacterium* leitet sich von der stäbchen- bis keulenförmigen Gestalt der Bakterien ab. Bei der Zellteilung bleiben die Tochterzellen bis zuletzt seitlich miteinander verbunden.

Heute wird *C. glutamicum* vor allem als Produktionsorganismus für verschiedene Aminosäuren sowie Vitamine genutzt. Hauptprodukte sind Glutamat, das als Geschmacksverstärker verwendet wird, und das Futtermitteladditiv Lysin (Leuchtenberger, 1996). Außerdem dient *C. glutamicum* als Modellorganismus für die nah verwandten humanpathogenen Organismen *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae*. Mit *Corynebacterium sepeidonicum* und *Corynebacterium fascians* besitzt die Gattung *Corynebacterium* auch pflanzenpathogene Vertreter. Eine wichtige Gemeinsamkeit innerhalb der Gruppe der *Corynebacterineae* ist die besondere Organisation der Zellhülle, die außerhalb der Zellwand unter anderem noch eine weitere Lipid-Doppelschicht, die sogenannte Mycomembran, enthält (Bayan *et al.*, 2003). Diese aus Mycolsäuren gebildete Lipid-Doppelschicht stellt eine zusätzliche Permeabilitätsbarriere für hydrophile Solute dar und unterscheidet *Corynebacterineae* von anderen Gram-positiven Bakterien. Für die antibiotische Behandlung von Infektionen mit pathogenen Bakterien der Unterordnung *Corynebacterineae* ist die Mycomembran ein wichtiger Angriffspunkt, da viele gängige Antibiotika nicht in das Cytoplasma von *Corynebacterineae* gelangen können.

1.2 Osmotischer Stress

C. glutamicum ist sowohl freilebend als auch in industriellen Fermentern starken Schwankungen der externen Osmolalität ausgesetzt. Im natürlichen Habitat ist die optimale Reaktion auf externe osmotische Bedingungen eine Grundvoraussetzung für Wachstum und

Vermehrung der Zellen, und für die industrielle Produktion von Aminosäuren stellen die osmotischen Bedingungen des Mediums einen wichtigen Parameter bei der Produktausbeute dar (Guillouet & Engasser, 1995a; Rönsch *et al.*, 2003; Varela *et al.*, 2003).

Nach dem Prinzip der Osmose stellen Cytoplasma und Umgebung zwei Lösungen dar, die durch die semipermeable Plasmamembran getrennt werden. Nach den Gesetzen der Thermodynamik streben die Wassermoleküle der Lösungen dabei grundsätzlich in das Kompartiment, in dem mehr Solute gelöst sind. Der Wassereinstrom erfolgt so lange, bis sich ein den Unterschied der Wasseraktivität ausgleichender osmotischer Druck eingestellt hat:

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

Π	= osmotischer Druck
R	= Gaskonstante
T	= absolute Temperatur
V_w	= partielles molares Volumen des Wassers
a_w	= Aktivität des Wassers

Wenn sich eine Bakterienzelle in wässriger Umgebung befindet, stellen die Bakterien im Cytoplasma eine höhere Konzentration gelöster Solute als in der Umgebung ein, sodass über die semipermeable Plasmamembran osmotischer Druck zu beobachten ist. Dieser osmotische Druck, hier Turgordruck genannt, wirkt dabei auf die Zellwand der Bakterien. Die Zellen halten den Turgordruck aufrecht, indem sie auch bei wechselnder externer Osmolalität ständig einen transmembranen Gradienten der Wasseraktivität gewährleisten. Der Turgordruck ist Voraussetzung für Wachstum und Vermehrung der Zellen (Koch, 1983). Er kann beim Gram-positiven *Bacillus subtilis* bis zu 20 bar betragen (Whatmore & Reed, 1990). Zum Vergleich: der Turgordruck des Gram-negativen *Escherichia coli* bei niedriger externer Osmolalität hat einen Wert von circa 2 bar (Cayley *et al.*, 2000). Wird das System durch Erhöhung der externen Wasseraktivität, zum Beispiel während eines Regenschauers, aus dem Gleichgewicht gebracht, liegt hypoosmotischer Stress vor. Dagegen kann hyperosmotischer Stress im natürlichen Habitat durch Trockenheit sowie im Fermenter durch Zufütterung weiterer Nährstoffe oder Exkretion des zu produzierenden Stoffes ins Medium durch die Zellen selbst verursacht werden. Während die Zellen bei hypoosmotischem Stress durch den vermehrtem Wassereinfluss zu platzen drohen, werden bei hyperosmotischem Stress wegen der Aufkonzentration aller im Cytoplasma gelösten Ionen und Moleküle die Zellfunktionen

gestört. Membranspannung und Turgordruck brechen zusammen. Zusammen bewirken diese Faktoren, dass weiteres Zellwachstum unmöglich wird und das Bakterium plasmolysiert.

Bakterienzellen können den Ein- und Ausstrom von Wasser nicht auf direktem Wege verhindern, da Zellmembran und Zellwand für Wasser permeabel sind. Sie können jedoch die intrazelluläre Menge an Osmolyten direkt beeinflussen und so auch den zellulären Wasserhaushalt und damit die cytoplasmatische Wasseraktivität steuern. Liegt hypoosmotischer Stress vor, werden Solute durch Öffnung mechanosensitiver Kanäle (Sukharev *et al.*, 1997) aus dem Cytoplasma entlassen. Die dadurch bedingte Senkung der cytoplasmatischen Solutkonzentrationen wirkt dem osmotisch bedingten Wassereinstrom entgegen. Die drei in *E. coli* gefundenen Kanäle MscL, MscS und MscM stehen für drei verschiedene Unterfamilien (Berrier *et al.*, 1996). Sie ermöglichen eine differenzierte Antwort auf verschieden starke hypoosmotische Stress-Situationen. Der bisher am besten erforschte Kanal MscL aus *E. coli* ist ein Homopentamer, dessen aminoterminalen Helices eine Art geschlossenen Kanal bilden, der sich bei entsprechender Membranspannung öffnet (Sukharev *et al.*, 2001). In *C. glutamicum* wurden zwei mechanosensitive Kanäle beschrieben, jedoch wird die Existenz eines weiteren vermutet (Nottebrock *et al.*, 2003).

Die Antwort auf hyperosmotischen Stress ist in den meisten Bakterien ähnlich und besteht aus mehreren Stufen (Wood, 1999; Poolman & Glaesker, 1998). Unmittelbar nach dem Eintreten hyperosmotischer Bedingungen werden Kaliumionen aufgenommen und Glutamationen als Gegenionen akkumuliert. In einer zweiten Phase werden Kalium und Glutamat durch sogenannte kompatible Solute (siehe auch Abschnitt 1.3) ersetzt, die je nach Verfügbarkeit aus dem Medium aufgenommen oder synthetisiert werden. Langfristig werden weitere osmoresponsive Gene exprimiert. Dazu gehören vor allem nicht konstitutiv exprimierte Gene für Synthese-Enzyme und Transporter für kompatible Solute.

Die verwendeten kompatiblen Solute sind je nach Organismus verschieden. In *E. coli* werden die unmittelbar nach einem hyperosmotischen Schock akkumulierten Kalium- und Glutamationen im Verlauf der Antwort auf osmotischen Stress durch Trehalose ersetzt (Larsen *et al.*, 1987; Dinnbier *et al.*, 1988), während *B. subtilis* sie in Minimalmedium durch neu synthetisiertes Prolin ergänzt (Whatmore *et al.*, 1990). War Betain im Medium enthalten, so ersetzte es Prolin als kompatibles Solut. *C. glutamicum* verwendet vor allem Prolin und Trehalose als kompatible Solute, und wenn extern verfügbar, Betain (Guillouet & Engasser, 1995a,b; Wolf *et al.*, 2003; Farwick *et al.*, 1995). *C. glutamicum* ist nicht in der Lage, selbst Betain zu synthetisieren (Farwick *et al.*, 1995).

1.3 Kompatible Solute

Kompatible Solute werden von Zellen akkumuliert, um dem bei hyperosmotischem Stress eintretenden Wasserausstrom durch Erhöhung der internen Solutmenge entgegen zu wirken. Sie können in hoher Konzentration im Cytoplasma vorliegen, ohne die Funktion der cytoplasmatischen Enzyme einzuschränken. Vielmehr können sie sogar die Struktur vor allem globulärer Proteine stabilisieren, was am präferenziellen Ausschluss kompatibler Solute von der Proteinoberfläche liegt. Die Interaktionen zwischen Proteinoberflächen und kompatiblen Soluten sind thermodynamisch unvorteilhaft (Arakawa & Timasheff, 1985). Da denaturierte Proteine im Allgemeinen eine größere Oberfläche besitzen als native, verschiebt die Anwesenheit kompatibler Solute das Denaturierungsgleichgewicht von Proteinen zu Gunsten der nativen Form.

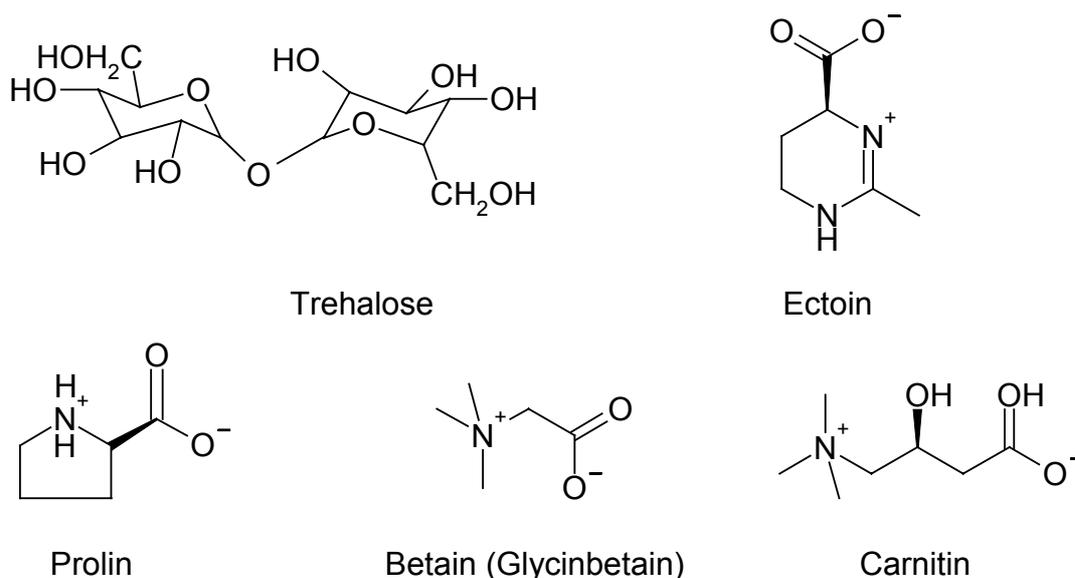


Abbildung 1.1: Strukturen verschiedener kompatibler Solute

Kompatible Solute sind strukturell vielfältig (siehe Abbildung 1.1). Trehalose, ein aus zwei α -(1,1)-verknüpften Glukosemolekülen bestehendes Disaccharid, dient in *C. glutamicum* ebenso als kompatibles Solut wie die Aminosäure Prolin, das Aminosäurederivat Glycinbetain, im Folgenden kurz Betain genannt, sowie Ectoin. Carnitin, das tierischen Ursprungs ist, wird unter anderem vom Lebensmittel verderbenden Bakterium *Listeria monocytogenes* als kompatibles Solut verwendet (Verheul *et al.*, 1997). Gemeinsam ist den kompatiblen Soluten,

dass sie eine hohe Löslichkeit besitzen und bis auf das ungeladene Zuckerderivat Trehalose bei physiologischem pH-Wert als Zwitterionen vorliegen.

Einige extrem halotolerante und halophile Bakterien und Archaeen begegnen hyperosmotischen Bedingungen auf andere Weise. Sie besitzen an Hochsalzbedingungen angepasste Enzyme und können daher intrazelluläre Konzentrationen von zum Teil über 4 M KCl einstellen (Martin *et al.*, 1999). Diese Art der Anpassung wird *salt-in*-Strategie genannt, im Gegensatz zur *salt-out*-Strategie der übrigen Organismen.

1.4 Import kompatibler Solute

Die Neusynthese kompatibler Solute ist für die Zellen energetisch aufwändiger als deren Import, der daher bei Vorhandensein kompatibler Solute in der Umgebung eine vorrangige Stellung einnimmt. Da der Import im Allgemeinen gegen den herrschenden Konzentrationsgradienten stattfindet, muss er mit einer Reaktion gekoppelt sein, die die notwendige Menge an freier Enthalpie bereitstellt. Diese Reaktion ist im Falle der sogenannten primären Transporter meistens die Spaltung einer Phosphat-Esterbindung eines Adenosintri-phosphatmoleküls oder eines anderen Nukleotidtriphosphatmoleküls. Bei primären Transportern finden Substratbindung, Translokation und ATP-Spaltung an verschiedenen Domänen statt. Weitere von primären Transportern genutzte Energie liefernde Reaktionen sind die Decarboxylierung von Carbonsäuren sowie Redox- und Lichtreaktionen der Atmungskette und der Photosynthese.

Sekundäre Transporter gewinnen die für die Translokation des Substrates nötige Energie durch den Transport eines ionischen Kosubstrates entlang dessen elektrochemischen Gradienten, oder sie erleichtern die Diffusion eines Substrates über die Membran entlang seinem vorhandenen elektrochemischen Gradienten. So genannte Symporter oder Kotransporter transportieren Substrat und Kosubstrat in gleicher Richtung über die Membran, Antiporter transportieren Substrat und Kosubstrat in entgegengesetzter Richtung. Wird ausschließlich das Substrat entlang seines elektrochemischen Gradienten transportiert, so spricht man von Uniport. Im Gegensatz zu primären Transportern können sekundäre Transporter auch lediglich einen Gegentausch zwischen internen und externen Substratmengen vermitteln. Ein typischer Reaktionszyklus eines Symporters ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

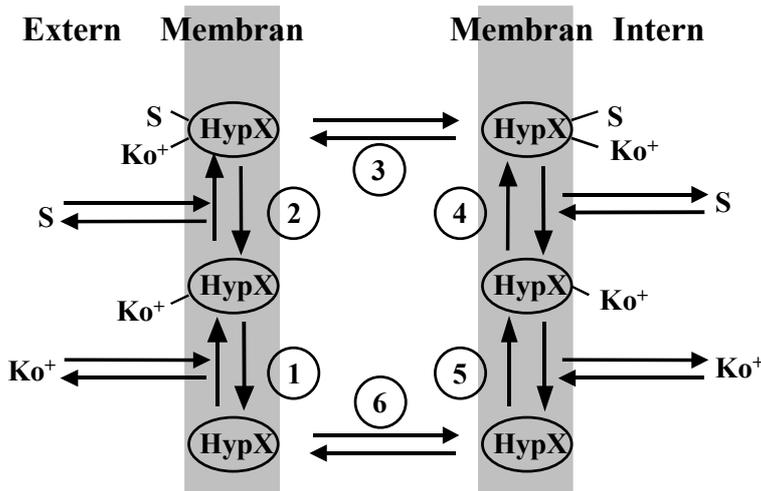


Abbildung 1.2: Reaktionszyklus eines typischen Symporters am hypothetischen Beispielprotein HypX. S=Substrat; Ko^+ = positiv geladenes Kosubstrat. Die Konzentration von S ist extern niedrig und intern hoch, die Konzentration von Ko^+ ist extern hoch und intern niedrig; außerdem besteht ein elektrischer Gradient, der durch einen cytoplasmatischen Anionenüberschuss und einen externen Kationenüberschuss charakterisiert ist.

Die Schritte 1 und 2 beschreiben die Bindung von Kosubstrat und Substrat an den Transporter. Nach einer Konformationsumwandlung des Transporters in Schritt 3, die zur Translokation von Substrat und Kosubstrat auf die cytoplasmatische Seite führt, werden in Schritt 4 und 5 Substrat und Kosubstrat ins Cytoplasma abgegeben. In Schritt 6 vollzieht der unbeladene Transporter erneut eine Konformationsänderung und steht für wieder die Bindung externen Substrates zur Verfügung. Neben dem vollständigen Importzyklus können sekundäre Transporter auch Gegentausch von Substrat katalysieren. In diesem Falle führt der Transporter die Schritte 2 bis 4 in beiden Richtungen durch. Prinzipiell ist auch die Gewinnung elektrochemischen Potentials durch Export von Substanzen entlang des Konzentrationsgradienten möglich, was zum Beispiel durch Milchsäurebakterien genutzt wird, die durch Produktexkretion zum transmembranen Protonenpotential beitragen (Konings, 2002).

In *C. glutamicum* wurden fünf Transportproteine für kompatible Solute mit verschiedener Substratspezifität beschrieben, deren Aktivität mit Ausnahme des Prolinaufnahmesystems PutP osmotisch reguliert ist (Peter *et al.*, 1997; Peter *et al.*, 1998b, Steger, 2003).

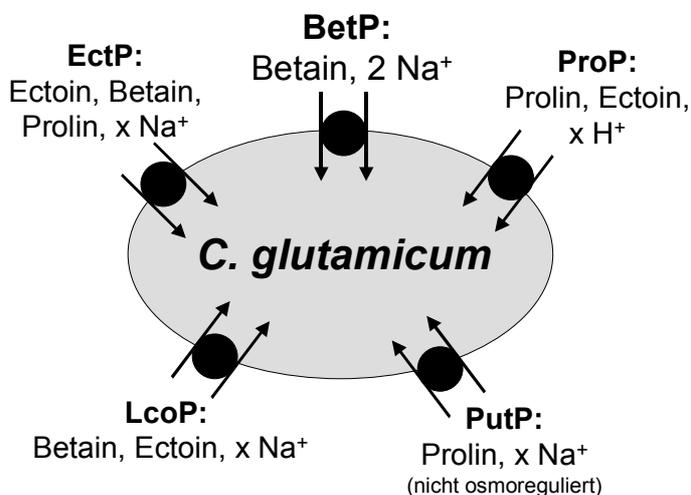


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Importproteine für kompatible Solute in *C. glutamicum*

Es handelt sich sämtlich um sekundäre Transporter. Während ProP Prolin und Ectoin im Symport mit Protonen transportiert, katalysiert EctP die Na^+ -vermittelte Aufnahme von Prolin, Ectoin und Betain. Substrate von LcoP sind Ectoin und Betain sowie ebenfalls Na^+ . BetP transportiert als kompatibles Solut ausschließlich Betain. Für BetP konnte eine Stöchiometrie von zwei Natriumionen pro Betainmolekül gezeigt werden. Das Protein besteht aus 595 Aminosäuren und hat eine Molekularmasse von 64,2 kDa. Laut Topologievorhersage besitzt BetP 12 Transmembranhelices sowie N- und C-terminale cytoplasmatische Extensionen (vgl. Abbildung 1.4). Es konnte experimentell bewiesen werden, dass die beiden Termini von BetP in Zellen im Cytoplasma und in Proteoliposomen im Lumen lokalisiert sind (Rübenhagen *et al.*, 2001; Schiller *et al.*, 2004b). Somit muss BetP eine gerade Anzahl an Transmembranhelices besitzen. Im solubilisierten Zustand und in zweidimensionalen Kristallen liegt BetP als Trimer vor (Ziegler *et al.*, 2004). BetP ist hochaffin für Betain ($K_M = 8,6 \mu\text{M}$), jedoch nur mäßig affin für das Kosubstrat Na^+ ($K_M = 4,1 \text{ mM}$).

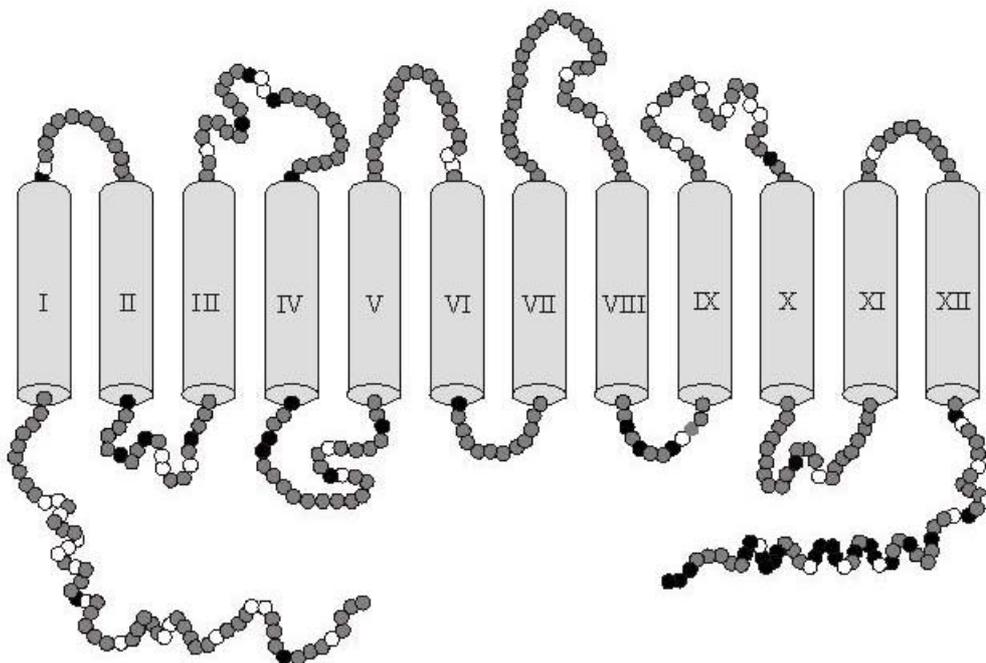


Abbildung 1.4: Sekundärstruktur-Topologiemodell von BetP. Die Topologievorhersage wurde mit dem Computerprogramm PHDThtmtop (EMBL, Heidelberg) durchgeführt. Die N- und C-terminalen Extensionen des Proteins sind zum Cytoplasma gerichtet. Die vorher gesagten Transmembrandomänen sind von I-XII durchnummeriert. Positiv geladene Aminosäuren sind schwarz, negativ geladene weiß dargestellt. Abbildung verändert nach Peter *et al.*, 1998a.

BetP, EctP und LcoP sind Mitglieder der BCCT-Proteinfamilie (Betain-Carnitin-Cholin-Transporter), ProP gehört dagegen der *major facilitator superfamily* (MFS) an (Peter *et al.*, 1998a; Saier, 2000). Im Stamm *C. glutamicum* DHPF, indem die Gene für alle fünf bekannten Transporter für kompatible Solute deletiert wurden (vgl. Abbildung 1.3), konnte nur noch eine sehr geringe Prolinaufnahme von unter $1 \mu\text{mol (g BTM)}^{-1} \text{ min}^{-1}$ gemessen werden, jedoch keine Betain- und Ectoinaufnahme (Morbach, unveröffentlichte Ergebnisse).

Die meisten Organismen besitzen wie *C. glutamicum* mehrere Transportsysteme für kompatible Solute. Eine Redundanz dieser Systeme ermöglicht oft die Nutzung verschiedener kompatibler Solute und vermittelt auf diese Weise einen Vorteil bei der Anpassung an hyperosmotischen Stress. Das Gram-positive Bakterium *B. subtilis* ist mit diversen primären und sekundären Transportern für kompatible Solute ausgestattet, darunter der sekundäre Betaintransporter OpuD (Kappes *et al.*, 1996) und der primäre Transporter OpuA (Kempf *et al.*, 1995). Die Gram-negativen Bakterien *E. coli* und *Salmonella typhimurium* besitzen unter anderem ein dem gleichnamigen Protein ProP aus *C. glutamicum* verwandtes Protein (Grothe *et al.*, 1986; Culham *et al.*, 2000, 2003; Cairney *et al.*, 1985a; McClelland *et al.*, 2001) und einen jeweils ProU genannten ABC-Transporter (Grothe *et al.*, 1986; Cairney *et al.*, 1985b; Stirling *et al.*, 1989). Hauptsubstrat für beide Proteine aus *S. typhimurium* ist allerdings Betain. Im Gram-positiven *Lactococcus lactis* ist der wichtigste Transporter für kompatible Solute ein primärer Betaintransporter, der unabhängig voneinander von zwei Gruppen isoliert wurde und BusA (Obis *et al.*, 1999) oder OpuA (Bouvier *et al.*, 2000) genannt wurde. Das Gram-positive Nahrungsmittelpathogen *L. monocytogenes* besitzt das BetP-Homolog BetL (41% Identität; Sleator *et al.*, 1999) und die primären Transporter Gbu (Ko *et al.*, 1999) und OpuC (Fraser *et al.*, 2000).

1.5 Wahrnehmung von osmotischem Stress durch Transporter und deren Regulation

Die Existenz osmotisch regulierter Transporter wirft die Frage nach der Perzeption osmotischen Stresses durch diese Proteine auf. Als Transmembranproteine können sie prinzipiell Veränderungen im Cytoplasma, in der Membran und im externen Kompartiment wahrnehmen. Zusätzlich können sie durch andere Proteine modifiziert werden, was jedoch die Frage nach deren sensorischen Eigenschaften aufwirft. Mögliche osmorelevante Stimuli sind in Wood (1999) zusammengefasst. Dazu gehören die externe Osmolalität, Wasseraktivität

und Ionenstärke, die gleichen Parameter im internen Kompartiment und die entsprechenden transmembranen Gradienten. Die Zusammenballung von Makromolekülen im Cytoplasma, auch *molecular crowding* genannt, ist eine weitere Folge osmotischen Stresses. Ebenfalls als osmorelevante Stimuli können die Membranspannung und der Turgordruck dienen. Die Ionenstärke kann außerdem Einfluss auf die Protein-Membran-Wechselwirkungen ausüben, womit eine weitere Möglichkeit der osmotischen Reizwahrnehmung besteht.

Die am besten untersuchten osmoregulierten bakteriellen Transporter für kompatible Solute sind ProP aus *E. coli*, OpuA aus *L. lactis* und BetP aus *C. glutamicum*. Allen diesen Transportern ist gemeinsam, dass sie *in vivo* nach einem hyperosmotischen Schock aktiviert werden (Grothe *et al.*, 1986; van der Heide *et al.*, 2000a; Farwick *et al.*, 1995). Im Proteoliposomen-System wurde für OpuA aus *L. lactis* eine Abhängigkeit der Aktivität von der intrazellulären Ionenstärke beschrieben, die über Änderungen der Oberflächeneigenschaften der Lipidmembran von Proteoliposomen wahrgenommen werden sollte (van der Heide & Poolman, 2000b; van der Heide *et al.*, 2001). ProP aus *E. coli*, der erste rekonstituierte Osmosensor, reagiert in Proteoliposomen auf osmotisch induzierte Änderungen der Konzentrationen von K^+ und Makromolekülen (Racher *et al.*, 1999; Culham *et al.*, 2003). BetP aus *C. glutamicum* ist in Proteoliposomen ein Sensor für die luminale Kaliumionenkonzentration. Dabei wird es auch von Rb^+ und Cs^+ aktiviert, nicht jedoch von Na^+ oder organischen Kationen (Rübenhagen *et al.*, 2001; Schiller *et al.*, 2004a). Alle drei Proteine vereinen somit osmosensorische und osmoregulatorische Eigenschaften.

Bei den Transportern ProP aus *E. coli* und BetP aus *C. glutamicum* wurde die Wahrnehmung osmotischen Stresses zusätzlich auf molekularer Ebene untersucht. Beide Transporter besitzen laut Topologievorhersage 12 Transmembrandomänen, und die C- und N-terminalen Extensionen liegen jeweils auf der cytoplasmatischen Seite (Culham *et al.*, 1993; Peter *et al.*, 1998a), was nur für BetP experimentell nachgewiesen wurde (vergleiche Abschnitt 1.4). Für beide Proteine ist die C-terminale Extension für die Osmoregulation von Bedeutung und Gegenstand ausführlicher Untersuchungen.

Ein der C-terminalen Domäne von ProP aus *E. coli* nachgebildetes Peptid von 45 Aminosäuren zeigte in circular dichroitischen Messungen ein für helikale Proteine typisches Elliptizitätsspektrum (Culham *et al.*, 2000), und die Sekundärstruktur des Proteins wies ein typisches *coiled-coil*-Motiv auf. Eine Dimerisierung des Peptides bei höheren Konzentrationen konnte nachgewiesen werden. Bestimmte Mutationen im C-terminalen Bereich, die *in vitro* eine Dimerisierung bei geringeren Polypeptid-Konzentrationen bewirkten, führten *in vivo* zu einer maximalen Aktivierung bei höheren externen Osmolalitäten im Vergleich zum

Wildtyp. Eine andere Mutation führte auch zu einer Verschiebung der zur maximalen Aktivierung nötigen externen Osmolalität, destabilisierte jedoch die Struktur des C-terminalen Polypeptids. Eine Deletionsmutante, der die letzten 26 Aminosäuren fehlten, war inaktiv.

Die C-terminale Domäne von BetP aus *C. glutamicum* ist dagegen hinsichtlich Struktur und Funktion verschieden. Ein dieser Domäne nachgebildetes Peptid zeigte in Anwesenheit von Detergenzmizellen aus Natriumdodekylsulfat α -helikale Struktur, während in Abwesenheit der Mizellen keine Struktur nachgewiesen werden konnte (Burger, 2002). Eine entsprechende BetP-Mutante ohne die C-terminalen 25 Aminosäuren war hinsichtlich der Aktivierung dereguliert: BetP Δ 25 zeigte auch ohne Applikation von osmotischem Stress Aktivität (Peter *et al.*, 1998a; Schiller *et al.*, 2004b).

1.6 Adaptationsregulation osmotisch aktivierter Transporter

Eine ideale Antwort auf osmotischen Stress schließt neben dem Import kompatibler Solute nach Auftreten der Stresssituation auch die Einstellung einer sinnvollen cytoplasmatischen Konzentration kompatibler Solute ein. Dies kann entweder durch Abschalten der Importproteine geschehen, oder kompatible Solute müssen die Zelle verlassen, sodass Import und Export sich ausgleichen und kein transmembraner Nettofluss kompatibler Solute mehr herrscht. Dieser Export kann entweder vom Importprotein selbst durch Transport-neutralen Gegentausch des Substrates vermittelt werden, oder es sind zusätzlich Kanäle oder spezifische Exporter beteiligt. Während für den Gegentausch keine Energie aufgewendet werden muss, wäre bei Beteiligung eines spezifischen Exporters der Aufwand für den Import des Substrates verschwendet. Ein Kanal könnte, falls sein Substratspektrum breit ist, sogar andere Solute aus dem Cytoplasma entlassen. Die bekannten mechanosensitiven Kanäle dienen ohnehin eher der Regulation nach hypoosmotischem Schock und würden daher erst öffnen, wenn die Membran durch einen Anstieg des Turgordrucks extrem gespannt ist (vergleiche Abschnitt 1.2).

Die Adaptation der Zellen und ihrer Transporter an hyperosmotische Bedingungen wurde bereits in einigen Bakterienarten untersucht. Dabei wurde jedoch dem durch die Transporter wahrgenommenen regulatorischen Stimulus für die Adaptationsregulation kaum Aufmerksamkeit zuteil, wenn man von der Interpretation der Ergebnisse als Inhibition des Transporters durch Bindung intern akkumulierten Substrates an eine hypothetische

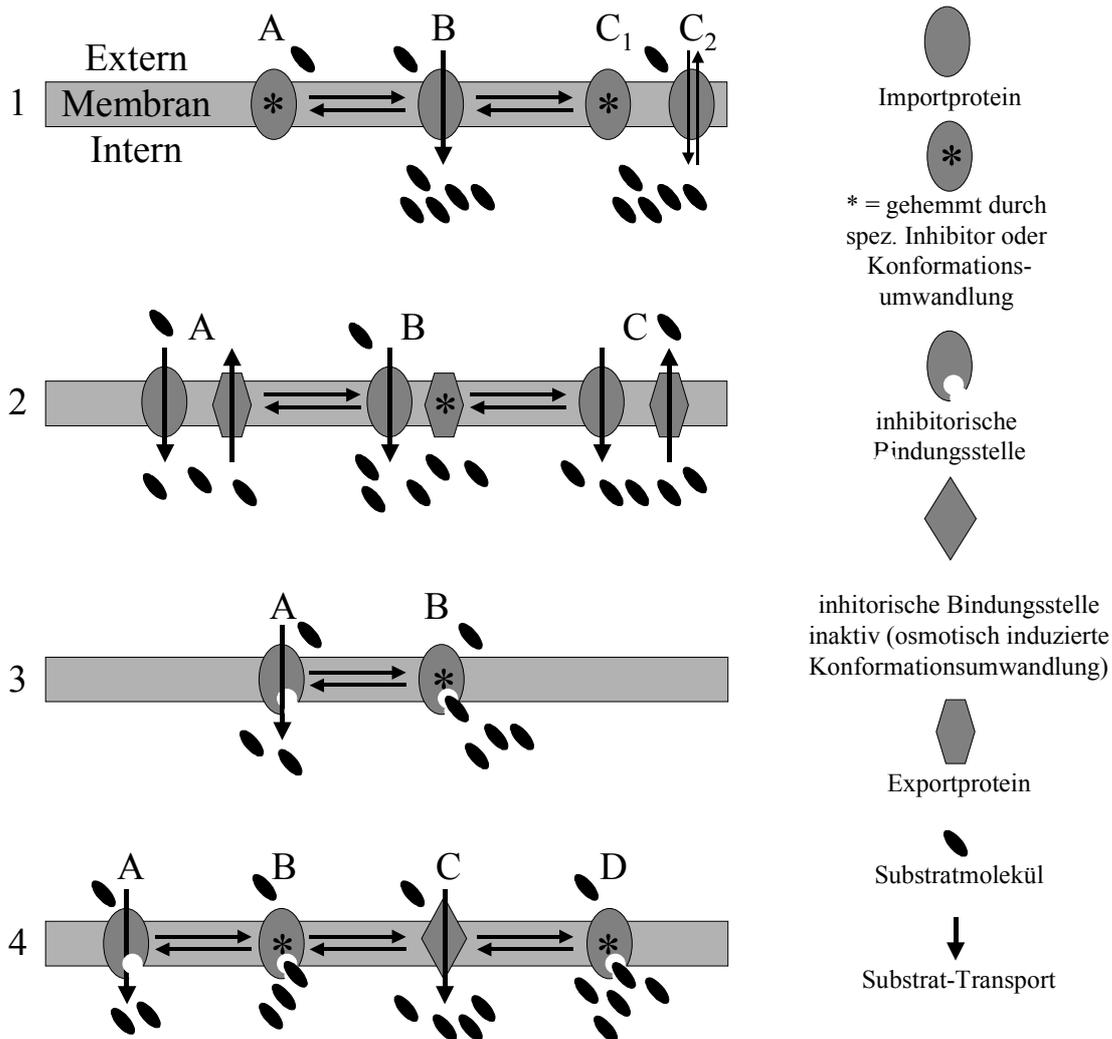


Abb. 1.5: Grundmechanismen der Regulation von Transportproteinen nach hyperosmotischem Stress (1, 2, 4) sowie Hemmung durch intern akkumuliertes Substrat (3).

(1) Der Transporter ist ohne osmotischen Stress (A) inaktiv, nach osmotischem Stress (B) aktiv und nach Adaptation an den Stress wieder inaktiv (C1) oder vermindert aktiv (C2), wobei bei sekundären Transportern Gegentauch beobachtet werden kann. Die Regulation der Proteinaktivität erfolgt über einen osmotisch relevanten Stimulus, der direkt auf das Protein wirkt. Beispiel: Aktivierung von BetP durch erhöhte Kaliumionenkonzentration.

(2) Der Importer ist ständig aktiv (A-C). Für die Regulation des Netto-Imports sorgt ein separates Exportprotein, das ohne osmotischen Stress den Import ausgleicht (A), bei osmotischem Stress jedoch inaktiviert wird (B). Nach Adaptation sind Import und Export wieder im Gleichgewicht (C).

(3) Der Importer ist nicht osmotisch reguliert, sondern nur durch intern akkumuliertes Substrat (A, B).

(4) Modifizierte Inhibition: Der Importer wird wie in (3) durch intern akkumuliertes Substrat gehemmt (A, B). Bei osmotischem Stress tritt eine Konformationsumwandlung ein und die inhibitorische Bindungsstelle wird unzugänglich (C). Ist der osmotische Stress durch Substratimport überwunden, wird die inhibitorische Bindungsstelle wieder zugänglich und das Protein inaktiv (D). Beispiel: OpuA aus *L. lactis* und die Betain- und Carnitinimporter aus *L. monocytogenes*.

Kombinationen und Variationen der Grundmodelle sind möglich: Die für *L. plantarum* beschriebene Regulation zum Beispiel entspricht Modell (2) mit einer zusätzlichen Regulation des Importers. In *S. typhimurium* wird der Importer durch hyperosmotischen Stress aktiviert (Modell 1 A, B). Da er jedoch nicht wieder deaktiviert wird, reguliert ein Exporter die interne Betainmenge (Modell 2 B, C). Die externe Substratkonzentration bleibt jeweils konstant.

inhibitorische Bindungsstelle absieht. Neben dieser Interpretation wurden in der Literatur zwei weitere Erklärungen für die Adaptation bei hyperosmotischem Stress diskutiert: eine Aktivitätsregulation des Importers durch einen nicht näher definierten separaten Faktor sowie die Existenz eines Exportcarriers.

Für *S. typhimurium* wurde ein spezifisches Effluxsystem für Betain und Prolin postuliert, welches die Menge des durch die Aufnahmesysteme akkumulierten Betains nach einem hyperosmotischen Schock kontrollieren sollte (Koo *et al.*, 1991). *Staphylococcus aureus*, in dem zwei sekundäre Betainimporter gefunden wurden (Pourkomaillian & Booth, 1992), zeigte eine reduzierte Betainaufnahme nach Adaptation an hyperosmotischen Stress (Pourkomaillian & Booth, 1994). Außerdem war die Betainaufnahme sowohl ohne als auch mit osmotischem Schock geringer, wenn die Zellen in betainhaltigem Medium gewachsen waren (Stimeling *et al.*, 1994). Beide Gruppen gingen daher von der Existenz einer inhibitorischen Bindungsstelle für intern akkumuliertes Substrat aus. In *Lactobacillus plantarum* war die akkumulierte Menge Betain von der Stärke des hyperosmotischen Schocks abhängig (Glaasker *et al.*, 1996a). Für die Regulation im Gleichgewicht wurde eine Verringerung der Importgeschwindigkeit durch Inhibition durch intern akkumuliertes Substrat und die Öffnung eines spezifischen Exportproteins postuliert (Glaasker *et al.*, 1996b; Glaasker *et al.*, 1998). Dabei inhibierte auch intern akkumuliertes Prolin die Aktivität des Transporters. Bei einem hyperosmotischen Schock sollte eine verstärkte Aktivierung sowohl durch Aufhebung der Inhibition als auch durch einen davon unabhängigen, nicht näher definierten Effekt eintreten. In *L. monocytogenes* war der sekundäre Betainimporter zunächst unabhängig von der externen Osmolalität aktiv, jedoch wurde je nach Osmolalität des Mediums verschieden viel Betain akkumuliert (Verheul *et al.*, 1997). Steigende Mengen an internem Carnitin und Betain inhibierten den Transporter, solange kein zusätzlicher hyperosmotischer Schock appliziert wurde. Die Betainaufnahme in *L. lactis* war dagegen nur von den osmotischen Bedingungen und nicht von einer Prolin-Vorbeladung abhängig (van der Heide & Poolman, 2000a). Daher wurde hier die Abwesenheit einer Inhibition durch internes Substrat postuliert.

Von den genannten Studien schlossen hauptsächlich die mit *L. plantarum* durchgeführten Studien detaillierte Bestimmungen der Import- und Exportflüsse ein. In einigen anderen Studien wurde dagegen nur der Einfluss von osmotischem Stress sowie der An- und Abwesenheit interner Substrate auf den Nettofluss von Betain über die Membran betrachtet, ohne die Möglichkeit von Efflux oder Gegentausch zu berücksichtigen. Der erfolgte Rückschluss auf die Inhibition des Transporters kann daher falsch positiv sein. Teilweise wurde nach einer Vorbeladung mit Prolin ein Rückschluss auf die Inhibition eines

Transporters getroffen, der Betain transportiert. Das häufig angeführte Modell der Inhibition durch internes Substrat ist für die Adaptation an hyperosmotische Situationen verschiedenen Ausmaßes ungeeignet, da es die Möglichkeit der Akkumulation unterschiedlicher Mengen kompatibler Solute in Antwort auf unterschiedlich starke Stress-Situationen ausschließt. Mit dem Modell der modifizierten Inhibition, das die Aufhebung der Inhibition bei osmotischem Stress beinhaltet, kann natürlich jegliche Adaptation an hyperosmotischen Stress erklärt werden. Allerdings muss auch eine zusätzliche Regulation der inhibitorischen Bindungsstelle in das Modell eingeführt werden (siehe Abbildung 1.5, Modell 4). Die Regulation wäre einfacher, wenn durch osmotischen Stress keine Bindungsstelle geschlossen oder geöffnet würde, sondern gleich die Proteinaktivität modifiziert würde.

1.7 Ziel der Arbeit

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden keine detaillierten Untersuchungen durchgeführt, wie Importproteine für kompatible Solute während der Adaptation an hyperosmotischen Stress reguliert sind und welche Rolle Exportsysteme bei der Adaptation spielen. Die vorhandenen Modelle zur Regulation der Transporter scheinen nicht überzeugend.

In dieser Arbeit sollten Aktivität und Regulation von BetP während der Anpassung von *C. glutamicum* an hyperosmotischen Stress genau charakterisiert werden. Neben einer detaillierten kinetischen Beschreibung von BetP-katalysierten Betainflüssen sollte der Reiz bestimmt werden, der von BetP im Zuge der Adaptationsregulation wahrgenommen wird. Weiterhin sollte beurteilt werden, inwieweit mechanosensitive Kanäle oder putative spezifische Betain-Exportsysteme an der Antwort von *C. glutamicum* auf osmotischen Stress beteiligt sind.

2 Material und Methoden

2.1 Stämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme *C. glutamicum* DHPF und *E. coli* MKH13 zeichneten sich dadurch aus, dass jeweils alle in den entsprechenden Organismen bekannten Gene für Importsysteme kompatibler Solute deletiert waren. Die verwendeten Plasmide dienten zur Überexpression von *betP* oder einer Mutante des Proteins.

Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete *C. glutamicum*- und *E. coli*-Stämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>C. glutamicum</i> DHPF	$\Delta betP \Delta putP \Delta proP \Delta ectP \Delta lcoP$	Steger, 2003
<i>E. coli</i> MKH13	<i>araD39 (argF-lac) U169 relA51 rps150 flbB5301 deoC ptsF25</i> $\Delta (putPA)101 \Delta (proP)2$ $\Delta (proU)608$	Haardt <i>et al.</i> , 1995
Plasmid	Genotyp	Referenz
pGTG	pEKEX 2 (Kan ^R <i>ori E. coli</i> , <i>ori C. glutamicum</i>) mit einem 1,8 kb großen <i>betP</i> -Fragment	Peter <i>et al.</i> , 1998a
pC2	pEKEX 2 (Kan ^R <i>ori E. coli</i> , <i>ori C. glutamicum</i>) mit einem 1,7 kb großen <i>betP</i> -Fragment (<i>betP</i> Δ 25)	Peter <i>et al.</i> , 1998a
pAcl1	pASK-IBA5- <i>betP</i> C252T; Amp ^R	Rübenhagen <i>et al.</i> , 2001

2.2 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

E. coli MKH13 wurde bei 37°C und 130 Umdrehungen pro Minute in LB-Medium oder Minimalmedium nach Davis und Mingioli (1950) kultiviert, *C. glutamicum*-Stämme bei 30°C und 130 Umdrehungen pro Minute in BHI-Medium (Beckton Dickinson France, Le Pont de Claix, Frankreich) oder MM1-Medium (Nottebrock *et al.*, 2003) kultiviert.

LB-Medium nach Sambrook *et al.* (1989)

10 g NaCl
10 g Trypton
5 g Hefe-Extrakt

ad 1 l aqua dest

BHI-Medium

37 g pulverförmiges BHI-Medium (Becton Dickinson France S. A., Le Pont de Claix, Frankreich) wurden in 1 l aqua dest gelöst.

Minimalmedium für *E. coli* nach Davis und Mingioli (1950)

8 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$
 3 g KH_2PO_4
 0,3 g Natriumcitrat
 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
 5 g Glukose

ad 1 l aqua dest

Die Glukose wurde getrennt autoklaviert. Nach dem Autoklavieren des Mediums wurden für den Stamm *E. coli* MKH13 je 4 mg/l Arginin, Isoleucin und Valin zugegeben.

MM1-Minimalmedium für *C. glutamicum* (verändert nach Nottebrock *et al.*, 2003)

5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 5 g Harnstoff
 2 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$
 2 g KH_2PO_4
 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
 0,01 g CaCl_2
 0,2 mg Biotin
 1 mg Deferoxamin
 40 g Glukose
 10 mg FeSO_4 oder 18,29 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
 10 mg MnSO_4 oder 11,19 g $\text{MnSO}_4 \cdot 1 \text{H}_2\text{O}$
 1 mg ZnSO_4 oder 1,78 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
 0,2 mg CuSO_4
 20 μg $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
 90 μg H_3BO_3
 60 μg $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
 9 μg $\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

ad 1 l aqua dest, pH 7

MgSO_4 , CaCl_2 , Deferoxamin, Biotin und die Spurensalze wurden als 1000-fache Lösungen angesetzt und separat sterilisiert. Glukose wurde in 12,5-facher Konzentration angesetzt und ebenfalls separat sterilisiert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Transformation von *E. coli* MKH13

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Methode von Chung *et al.* (1989). 10 ml LB-Medium wurden mit einer Übernachtskultur im Verhältnis 1:100 angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀ von 0,4 geschüttelt. Pro Transformationsansatz wurde 1 ml abgenommen und für 10 min bei 2000g und 4°C sedimentiert. Das Pellet wurde in 100 µl TSS-Lösung (LB-Medium mit 10 % Polyethylenglykol, 5 % DMSO und 50 mM MgCl₂) resuspendiert. Nach der Zugabe von 1 µl Plasmid wurde der Ansatz für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 900 µl SOC-Medium (2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,4 % NaCl, 10 mM MgCl₂, 2,5 mM KCl, 0,36 % Glukose) zugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden für 10 min bei 2000g und 30°C sedimentiert, der Überstand dekantiert und das Pellet im Rückfluss resuspendiert. Die Bakterienlösung wurde zur Selektion auf Ampicillinresistenz auf LB-Platten mit Carbenicillin ausgestrichen und über Nacht inkubiert.

2.3.2 Transformation von *C. glutamicum* DHPF

Die Transformation erfolgte nach der Methode von van der Rest *et al.* (1999) mit leichten Änderungen. 5 ml LB-Medium mit 2 % Glukose werden mit einer Dauerkultur im Verhältnis 1:100 angeimpft und über Tag inkubiert. Mit dieser Kultur wurde in 500 ml LB-Medium mit 4 mg/ml Isonicotinsäureanhydrid, 2,5% Glycin und 0,1% v/v Tween-80 in einem 2-l-Kolben eine optische Dichte von OD₆₀₀ = 0,3 eingestellt. Die Zellen wurden über Nacht bei Raumtemperatur bei 160 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen 20 min auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und vier Mal mit 4°C kaltem 10 %-igem Glycerin gewaschen. Danach wurde das Pellet in 1 ml 10 %-igem Glycerin aufgenommen, zu je 50 µl aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

50µl kompetente Bakterien und 2µl der zu transformierenden DNA wurden in eine Elektroporationsküvette (Peqlab, Erlangen) gegeben. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV und 600 Ω (Gene Pulser II, Pulse Controller II, Biorad, Hercules, CA, USA). Die Zellen wurden in 1ml BHI-Medium mit 0,5 M Sorbit aufgenommen und 1 h bei 30°C leicht

geschüttelt. Anschließend wurden die Kulturen zur Selektion resistenter Klone auf BHI-Agar-Platten mit Kanamycin ausgestrichen.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Synthese von [¹⁴C]- und [³H]-Betain

Die Betainsynthese erfolgte nach der modifizierten Methode von Landfald und Strøm (1986) durch Oxidation radioaktiv markierten Cholins. Dazu wurde [Methyl-¹⁴C]-Cholinchlorid mit 30 U Cholinoxidase aus *Alcaligenes spec.* (Sigma, Steinheim) in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8 über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 0,4 Volumina 0,7 M HClO₄ wurde die Reaktion gestoppt. Die Reinigung des entstandenen Betains erfolgte durch Kationenaustauschchromatografie (Dowex 50 W x 8, Ø 0,5 cm, Höhe 2 cm). Das Säulenmaterial wurde zunächst mit 1 M HCl in die H⁺-Form überführt. Die Reaktionslösung wurde aufgetragen, die Säule einmal mit 1 ml 1 M HCl gewaschen und das Betain mit 1 ml 2 M Ammoniak eluiert. Die Reinheit des [Methyl-¹⁴C]-Betains wurde nach der Methode von Blunden *et al.* (1981) mittels Dünnschichtchromatographie überprüft. Nach einer Laufzeit von 6 h (Laufmittel Ethanol:Wasser 1:1 (v/v), Kieselgel TLC-Platten, Merck KGaA, Darmstadt) wurde das Chromatogramm mit dem Bio-Imaging Analyzer BAS-1800 (Fujinon Europe GmbH, Willich) ausgewertet. Die Synthese von [³H]-Betain aus [³H]-Cholin erfolgte analog.

2.4.2 Betain-Transportmessungen mit *C. glutamicum*-Zellen

Die Transportaktivität von BetP wurde mittels schneller Membranfiltration bestimmt. Die Zellen wurden über Nacht in BHI-Medium oder MM1-Medium mit jeweils 50 mg/l Kanamycin geschüttelt. Zur Induktion von *betP* wurden 0,2 mM IPTG zugegeben. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in Puffer aus 25 mM KPi, 25 mM NaPi pH 7,5 oder in Puffer aus 50 mM KPi pH 7,5 gewaschen und in dem gleichen Puffer mit 10 mM Glukose aufgenommen. Die Zelldichte wurde so eingestellt, dass in der Messung circa 0,1 g BTM/l vorlagen. Der Versuch wurde gestartet, indem ein hyperosmotischer Schock durch Zugabe von festem Osmolyt oder durch Mischung der Zellsuspension mit hyperosmolalem Puffer appliziert wurde oder die Zellen in isoosmolalen Puffer bei 30°C überführt wurden. Nach

30 Sekunden wurde die Aufnahme von Betain durch Zugabe von 0,5 mM [^{14}C]- oder [^3H]-markiertem Substrat gestartet. Nach diskreten Zeitabständen wurden Aliquote der Zellsuspension auf Glasfaserfilter einer Mehrfachfiltrationsanlage gegeben und zweimal mit je 2,5 ml 0,1 M LiCl gewaschen. Die Filter wurden mit 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit (Rothiszint eco plus, Roth, Karlsruhe) versetzt und die aufgenommene Radioaktivität mit einem Szintillationszähler ausgezählt. Zur Bestimmung der gesamten Radioaktivitätsmenge im System wurde zusätzlich ein Aliquot direkt mit Szintillationsflüssigkeit versetzt. Für die Berechnung der aufgenommenen Radioaktivität pro Zelltrockenmasse wurde angenommen, dass eine Zelltrockenmasse von 0,36 mg/ml Zellsuspension einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600} = 1$ entspricht, wie es für den Wildtyp *C. glutamicum* ATCC13032 beschrieben wurde (Weinand, 2004).

2.4.3 Doppelmarkierungsexperimente

Um zwischen Betain-Nettoimport v_{net} , unidirektionalem Influx v_{in} und Efflux v_{ef} , die über die Gleichung $v_{\text{net}} = v_{\text{up}} - v_{\text{ef}}$ in Beziehung stehen, zu unterscheiden, wurden Doppelmarkierungsexperimente durchgeführt. Nach Wachstum der Zellen in MM1-Medium ist zu Versuchsbeginn kein Betain in den Zellen und nach Zugabe von [^{14}C]-Betain sind v_{net} und v_{up} identisch. v_{net} kann jederzeit korrekt bestimmt werden, da interne und externe Betainmenge stets die gleiche spezifische Radioaktivität hinsichtlich [^{14}C]-Betain besitzen. v_{up} kann im Versuchsverlauf nicht mehr mit der ersten Markierung bestimmt werden, da die Markierung intern akkumulieren kann und ihre Effluxgeschwindigkeit v_{ef} unbekannt ist. Zur Unterscheidung aller drei Betainflüsse wurde trägerfreies [^3H]-Betain zu bestimmten Zeitpunkten während des Experiments zu Aliquoten der Zellsuspension zugegeben. [^3H]-Betain war dann jeweils nur extern vorhanden und diente zur Bestimmung von v_{up} . Da v_{net} jederzeit durch Messung Flusses der [^{14}C]-Markierung bestimmbar war, konnte v_{ef} mit Hilfe der Gleichung $v_{\text{net}} = v_{\text{up}} - v_{\text{ef}}$ berechnet werden.

2.4.4 Glutamin-Transportmessungen mit *C. glutamicum*-Zellen

Um das transmembrane Natriumionenpotenzial während eines typischen Aufnahmeversuches einzuschätzen, wurde parallel zur Betainaufnahme die Aufnahme von Glutamin getestet. Der

Glutaminimport wird in *C. glutamicum* durch einen sekundären Transporter im Symport mit Natriumionen vermittelt und ist ausschließlich vom Natriumpotenzial abhängig.

Die Übernachtkultivierung und die Vorbereitung der Zellen für die Transportmessung erfolgten wie für Betain-Transportmessungen. Die Betainaufnahme wurde mit [³H]-Betain gestartet. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Aliquote der Zellsuspension abgenommen und auf 0,1 mM [¹⁴C]-Glutamin (Endkonzentration) gegeben. Für die Bestimmung des Glutaminimportes direkt nach dem hyperosmotischen Schock oder ohne hyperosmotischen Schock wurden [¹⁴C]-Glutamin und [³H]-Betain gleichzeitig zugegeben.

2.4.5 Betain-Transportmessungen mit *E. coli*-Zellen

Übernachtkultivierung und Messung erfolgten wie mit *C. glutamicum*-Zellen mit folgenden Unterschieden: Die Zellen wurden über Nacht in Minimalmedium nach Davis und Mingioli (1950) mit 50 mg/l Carbenicillin kultiviert und die Induktion von *streptP* erfolgte mit 200 µg/l Anhydrotetracyclin für 3 h. Waschpuffer war 100 mM Tris/MES pH 7,5, zu dem zur Energetisierung 10 mM Glukose zugegeben wurden.

2.4.6 Volumenbestimmung von *C. glutamicum*-Zellen

Die Volumenbestimmung erfolgte nach der Methode von Rottenberg (1979) unter Verwendung von Wasser als permeablem und Taurin als impermeablem Solut. Die Trennung der Zellen vom Medium erfolgte mittels Zentrifugation durch eine Silikonölschicht.

Zellanzucht und osmotischer Schock wurden wie bei Transportmessungen vorgenommen. Betain wurde 30 s nach dem hyperosmotischen Schock zugegeben. 700 µl Zellen wurden mit 20 mM Taurin (Endkonzentration) sowie $1 \cdot 10^6$ dpm ³H₂O und $3 \cdot 10^5$ dpm [¹⁴C]-Taurin versetzt und für 1 min inkubiert. Anschließend wurden je 200 µl Lösung in 3 Zentrifugationsröhrchen (*micro test tube* 400 µl, Beckman, Krefeld) pipettiert, die mit 30 µl 20 % HClO₄ und 70 µl Silikonöl (d=1,06 g/l, Geschenk der Firma Wacker, Burghausen), vorbeladen waren. Nach Zentrifugation für 30 s (Microfuge E, Beckman, Krefeld) wurden je 100 µl des Überstands der drei Zentrifugationsröhrchen abpipettiert und in einem Szintillationsgefäß vereinigt. Das Zellpellet wurde aus den abgetrennten Spitzen der Zentrifugationsröhrchen durch Zentrifugation für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit in

der Eppendorf-Zentrifuge gewonnen. Das Pellet wurde mit 200 µl Wasser resuspendiert und in ein Szintillationsgefäß überführt. Nach Zugabe von 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit wurde die Radioaktivität in einem Szintillationszähler bestimmt.

Der Quotient aus der ^3H -Aktivität im Pellet und der Volumenaktivität des $^3\text{H}_2\text{O}$ ergab das Gesamtvolumen des Pellets. Der Quotient der ^{14}C -Aktivität im Pellet und der ^{14}C -Volumenaktivität ergab den extracytoplasmatischen Volumenanteil im Pellet. Die Differenz war der Volumenanteil der Zellen. Division durch die Biotrockenmasse der eingesetzten Zellen ergab das Volumen des Cytoplasmas.

$$V_C = V_{\text{Probe}} \cdot \frac{\frac{A_{[^3\text{H}]_{\text{Pellet}}]}{A_{[^3\text{H}]_{\text{Überstand}}} - \frac{A_{[^{14}\text{C}]_{\text{Pellet}}]}{A_{[^{14}\text{C}]_{\text{Überstand}}}}{\text{BTM}}$$

V_C = Cytoplasmavolumen (besser: Volumen frei verfügbaren Wassers)

A = gemessene Aktivität (Zerfälle pro Minute)

BTM = Biotrockenmasse

2.4.7 Bestimmung interner Solute: Versuchs- und Aufschluss-Bedingungen

Für die Bestimmung interner Gehalte an Kalium und organischen Soluten wurden die Zellen über Nacht inkubiert, gewaschen und osmotisch geschockt wie für die Transportmessungen. Für den Versuch, der die Anpassung an hyperosmotischen Stress ohne die Möglichkeit der Betainaufnahme darstellen sollte, wurden die Zellen in Minimalmedium gewaschen und osmotisch geschockt. Die Zelldichte wurde auf 0,4-1 g BTM/l eingestellt. 5 mM Betain wurden 30 s nach dem hyperosmotischen Schock zugegeben, wenn nicht anders erwähnt. Die Differenzen zu den Transportexperimenten hinsichtlich Zelldichte und Betainkonzentration ergaben sich aus dem größeren Bedarf an Zellmaterial für die Bestimmung interner Solute und eine entsprechend höhere notwendige externe Betainmenge. Die Zellen wurden für Kaliummessungen mittels schneller Membranfiltration unter zweimaligem Spülen mit je 2,5 ml isoosmolarem MOPS-Puffer und für die übrigen mittels Solute Zentrifugation nach einmaligem Waschen in Medium abgetrennt. Für Kalium- und Aminosäureanalysen wurden

die Zellen durch Inkubation mit 0,1 % (w/v) CTAB für 7 min aufgeschlossen und die lösliche Fraktion durch 15-minütige Zentrifugation in der Mikrozentrifuge von den Zelltrümmern getrennt. Für die Bestimmung von Trehalose wurden die Zellen 20 min bei 70°C in Methanol inkubiert, bevor die Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt wurden. Für die Bestimmung von Betain wurden die Zellen nach der Methode von Bligh und Dyer (1959), modifiziert durch Galinski und Herzog (1990) aufgeschlossen. Dazu wurden 4 mg Zellmaterial mit 250 µl eines Methanol-Wasser-Chloroform-Gemisches (10:4:5) für 15 min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 130 µl Chloroform und weiterer Inkubation für 15 min unter Schütteln bei Raumtemperatur wurde das Gemisch 5 min bei Höchstgeschwindigkeit in der Mikrozentrifuge abzentrifugiert, die wässrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und analysiert.

2.4.7.1 Bestimmung der internen Kaliummenge

Kalium wurde flammenfotometrisch (ELEX 6361, Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Als Brenngas wurde ein Luft/Propan-Gemisch verwendet. Das Gerät wurde vor jeder Messreihe unter Verwendung von Standards im Bereich 0 bis 100 µM kalibriert und die Proben entsprechend mit Wasser verdünnt.

2.4.7.2 Bestimmung der internen Betainmenge

Betain wurde mittels HPLC nachgewiesen (HPLC 126NM, Beckman, Krefeld). Als Trennsäule diente eine Polyamine2-Säule (YMC, Schermbeck, Deutschland). Es wurden 20 µl Probe verwendet. Beladung und Elution der Säule wurden isokratisch mit 70 % Acetonitril bei 1,5 ml/min betrieben. Betain wurde im Brechungsindex-Detektor bei 40°C nachgewiesen (ERC-7515A, ERC, Riemerling) und nach Kalibration mit Standards im Konzentrationsbereich von 5 bis 200 µg quantifiziert.

2.4.7.3 Bestimmung der internen Prolinmenge

Die Proben wurden mittels Reverse-Phase-HPLC (HP 1100 liquid chromatograph, HP1046A fluorescence detector, Hewlett Packard, Bad Homburg) mit automatisierter

Fluoreszenzderivatisierung analysiert. Prolin wurde mit 9-Fluorenyl-methyl-chlorformiat/Acetonitril derivatisiert. Die Auftrennung erfolgte über eine EC 125/4 Nucleodur 100-5 C18 ec-Säule (MN Chromatographie, Düren), wobei ein Gradient von 5 % bis 100 % hydrophober flüssiger Phase eingesetzt wurde. Als hydrophobe Phase wurde Acetonitril:Methanol (1:1) eingesetzt, als hydrophile Phase ein Gemisch aus 35 mM Natriumacetat, pH 6,5 und hydrophober Phase im Verhältnis 19:1.

2.4.7.4 Bestimmung der internen Trehalosemenge

Cytosolproben und Standards von 0,1 bis 0,4 g/l Trehalose wurden mit 1 g/l Inosit als internem Standard versetzt und unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Nach Zugabe von 65 µl Methoxamin in Pyridin (20 mg/ml) wurden die Proben 1 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 35 µl N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid zugegeben und die Mischung für 1,5 h bei 65°C inkubiert. Die Trehalosekonzentration in den Proben wurde durch Gaschromatografie mit anschließender Flammenionisationsdetektion bestimmt (Trace GC, ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA).

Injektion und Detektion erfolgten bei 280°C. Die Trennung erfolgte über einen linearen Temperaturgradienten von 160°C bis 280°C bei einer Heizrate von 12°C/min, beginnend 2 min nach der Injektion und endend mit einem Plateau von 3 min bei 280°C.

3 Ergebnisse

3.1 Aufnahme von Betain durch BetP

Zum basalen Verständnis des Imports kompatibler Solute durch BetP während der Adaptation an osmotischen Stress wurden zunächst einfache Aufnahmeversuche durchgeführt. Nach Variation der externen Osmolalität wurde die Betainaufnahme in *C. glutamicum* DHPF pGTG (*betP*) über einen längeren Zeitraum verfolgt und der Einfluss des Membranpotenzials auf die Betainaufnahme beurteilt. Der Stamm *C. glutamicum* DHPF besitzt keine bekannten Transporter für kompatible Solute und zeigt keine Betainaufnahme. Die plasmidkodierte Expression des *betP*-Genes unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors gewährleistet in diesem Stammhintergrund, dass der Betainimport ausschließlich durch BetP vermittelt wird und *betP* in den verschiedenen Experimenten gleichmäßig exprimiert wird. Um Interferenzen durch Synthese kompatibler Solute mit der Betainaufnahme durch BetP zu verringern, wurde in fast allen Experimenten Chloramphenicol zu den Zellen gegeben. Dieses Antibiotikum blockiert die Neusynthese von Proteinen und verhindert den expressionsregulierten Teil der Antwort auf osmotischen Stress.

3.1.1 Einfluss der Osmolalität auf die Betainaufnahme

In Abbildung 3.1 ist die Betainaufnahme durch BetP ohne und mit hyperosmotischem Stress dargestellt. Die Zellen waren über Nacht in Minimalmedium gewachsen, wurden mit Puffer aus jeweils 25 mM Kaliumphosphat und Natriumphosphat, pH 7,5 gewaschen und mit 10 mM Glukose energetisiert. Betain wurde jeweils 30 s zugegeben, nachdem die Zellen entweder einem hyperosmotischen Schock ausgesetzt wurden oder ohne Schock auf 30°C temperiert wurden. Ein hyperosmotischer Schock von 116 mOsm/kg auf 593 mOsm/kg durch Zugabe von 250 mM NaCl bewirkte einen schnellen Influx von Betain in die Zellen mit einer Anfangsgeschwindigkeit von $62 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$. Wurden 400 oder 740 mM NaCl zugegeben, ergaben sich Osmolalitäten von 897 und 1564 mOsm/kg; die initiale Aufnahmegeschwindigkeit betrug in beiden Fällen je $102 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$. Die Phase schnellen Betainimports dauerte jeweils etwa 5 bis 10 Minuten an. Danach verlangsamte sich in allen Ansätzen der Nettoimport von Betain auf $2\text{-}3 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$. Diese Phase der Antwort auf osmotischen Stress wurde als Adaptationsphase bezeichnet. Wurden die Zellen in

30°C warmen Puffer überführt, ohne einem hyperosmotischen Schock ausgesetzt zu werden, konnte Betainimport mit einer initialen Geschwindigkeit von $6 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$ beobachtet werden, die nach kurzer Zeit auf $1,4 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$ sank. In keiner beobachteten Situation kam es zu einem völligen Stillstand des Nettoimports.

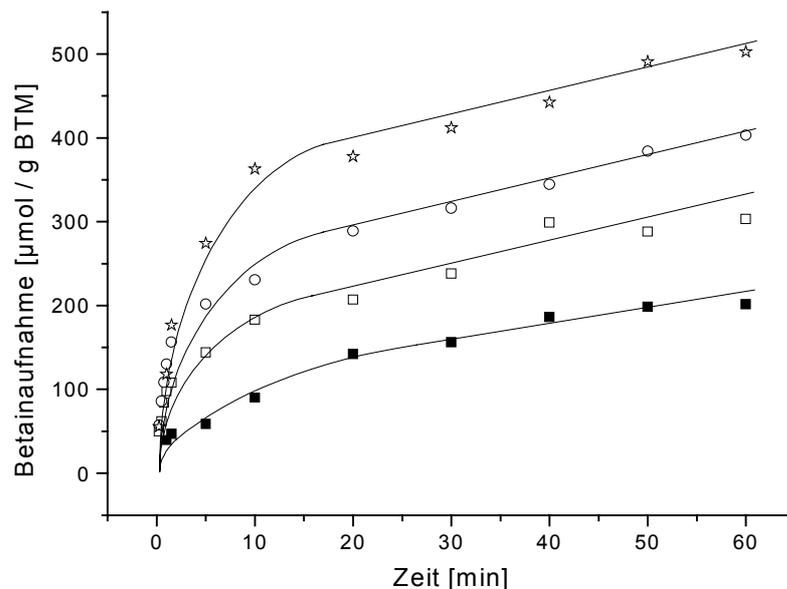


Abbildung 3.1: Aufnahme von Betain durch BetP ohne und mit hyperosmotischem Schock nach Wachstum in MM1-Medium. Ausgehend von einer basalen Osmolalität von 116 mOsm/kg und einer Temperatur von 4°C, die durch das Waschen der Zellen mit 25 mM KPi 25 mM NaPi pH 7,5 eingestellt wurden, wurden die Zellen in 30°C warmen Puffer der gleichen Osmolalität (geschlossene Quadrate) oder mit zusätzlich 250, 400 oder 740 mM NaCl, entsprechend 593, 897 oder 1564 mOsm/kg (offene Quadrate, Kreise und Sterne) überführt. Nach 30 s wurden 0,5 mM [^{14}C]-Betain als Substrat sowie 25 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol zugegeben.

Die Initialgeschwindigkeit von BetP war vom Ausmaß des osmotischen Schocks abhängig. In früheren Experimenten war eine maximale Aktivierung von BetP bei Zugabe von 1200 mOsm Natriumchlorid beobachtet worden (Peter *et al.*, 1998a). Die während der zweiten Phase der Antwort auf den osmotischen Stress akkumulierte Menge an Betain war linear abhängig von der externen Osmolalität (vergleiche Abschnitt 3.4.2). Weiterhin konnte eine geringe basale BetP-Aktivität auch ohne die Applikation eines hyperosmotischen Schocks festgestellt werden. Die Schwelle für eine signifikante Aktivierung von BetP in *C. glutamicum* wurde in einer früheren Arbeit bei 300 mOsm/kg festgestellt (Peter *et al.*, 1998b).

In dem in Abbildung 3.2 dargestellten Experiment wurde geprüft, ob BetP in der Adaptationsphase erneut aktivierbar war. Dazu wurden die Zellen mit 250 mM NaCl versetzt, sodass sich ein osmotischer Schock von 116 auf 593 mOsm/kg ergab. Nach einer Stunde

wurden weitere 490 mM NaCl zugegeben, um eine Osmolalität von 1564 mOsm/kg zu erreichen. In weiteren Ansätzen wurden zum Vergleich KCl statt NaCl für den ersten oder den zweiten hyperosmotischen Schock verwendet.

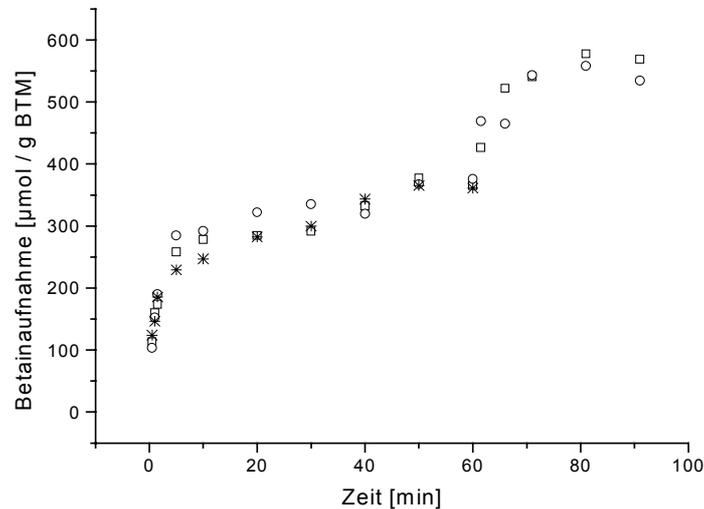


Abbildung 3.2: Wiederholte Aktivierung von BetP und Aktivierung von BetP nach Schock unter Verwendung der Osmolyte NaCl und KCl.

Ausgehend von einer basalen Osmolalität von 116 mOsm/kg und einer Temperatur von 4°C wurden die Zellen in 30°C warmen Puffer mit 250 mM NaCl (Kreise, Quadrate) oder KCl (Sterne), entsprechend 593 mOsm/kg überführt. Nach 60 min erfolgte eine zusätzliche Addition von 490 mM NaCl (Quadrate) oder KCl (Kreise), um eine Osmolalität von 1564 mOsm/kg zu erreichen. 30 Sekunden nach dem ersten hyperosmotischen Schock wurden 0,5 mM [^{14}C]-Betain als Substrat sowie 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Chloramphenicol zugegeben.

Nach Zugabe von Natriumchlorid wurde in allen Ansätzen eine kurze, schnelle Aufnahme von Betain beobachtet, gefolgt von einer Phase langsamer Betainaufnahme. Damit entsprach die Betainaufnahme nach dem ersten hyperosmotischen Schock der des in Abbildung 3.1 gezeigten Versuchs. Der zweite hyperosmotische Schock bewirkte eine erneute schnelle Aufnahme von Betain, die ebenfalls circa 5-10 Minuten andauerte, jedoch eine geringere Netto-Importgeschwindigkeit von Betain aufwies als nach dem ersten hyperosmotischen Schock (vergleiche Tabelle 3.1). Die Modulation des Betainimports während der Adaptation an einen hyperosmotischen Schock war damit reversibel, BetP erneut aktivierbar.

Tabelle 3.1: Betain-Aufnahmegeschwindigkeit nach hyperosmotischen Schocks wie in Abb. 3.2. Die angegebenen Werte für die Geschwindigkeit repräsentieren die Steigung einer Gerade durch die ersten drei Messwerte nach dem jeweiligen hyperosmotischen Schock, entsprechend 15, 30 und 45 Sekunden nach Zugabe des Osmolyten. Die Messwerte sind Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente.

Verwendeter Osmolyt für hyperosmotische Schocks		Netto-Aufnahmegeschwindigkeit [$\mu\text{mol} (\text{min} \cdot \text{g BTM})^{-1}$]	
1. Schock (t=0min) 116 => 593 mOsm/kg	2. Schock (t=60min) 116 => 593 mOsm/kg	1. Schock	2. Schock
250 mM NaCl	490 mM NaCl	68,0	18,4
250 mM NaCl	490 mM KCl	70,4	13,0
250 mM NaCl	980 mM Prolin	53,4	17,4
250 mM KCl	-	61,7	-

Wurde Kaliumchlorid statt Natriumchlorid als Osmolyt verwendet, so wurden ähnliche Werte für die Aufnahmegeschwindigkeit gemessen; die in der Adaptationsphase akkumulierte Menge Betain war nahezu identisch. Um den Einfluss eines organischen Osmolyten zu testen, wurde der zweite hyperosmotische Schock auch mit Prolin durchgeführt. Prolin konnte in diesem Falle als Osmolyt und nicht als kompatibles Solut dienen, da der verwendete Stamm *C. glutamicum* DHPF kein Prolin importieren kann und Prolin nicht Substrat von BetP ist. Die Aufnahmegeschwindigkeit entsprach der nach Schocks mit NaCl oder KCl.

Die vorliegenden Experimente zeigten, dass die gemessenen Aufnahmegeschwindigkeiten und die Mengen an akkumuliertem Betain weitgehend unabhängig von der chemischen Natur der osmotischen Stimuli waren.

3.1.2 Einfluss des Membranpotenzials

In den bisherigen Experimenten wurde in einem Zeitraum von 5 bis 10 Minuten nach der Aktivierung durch hyperosmotischen Schock eine Senkung der Nettoimportgeschwindigkeit von Betain beobachtet. Prinzipiell kann dieser Effekt durch einen regulatorischen Vorgang bedingt sein, oder die treibende Kraft der Reaktion kann entfallen. BetP importiert Betain in die Zelle im Symport mit zwei Na^+ -Ionen und wird durch das über der Membran anliegende elektrochemische Natriumpotenzial angetrieben (Farwick *et al.*, 1995). Daher könnten die Aktivierung von BetP nach einem hyperosmotischen Schock und der Eintritt in die Adaptationsphase durch eine Erhöhung oder einen Abfall des elektrochemischen Natriumpotenzials verursacht worden sein.

Um Änderungen in der Höhe des Natriumpotenzials während eines typischen Aufnahmeversuchs abschätzen zu können, wurde die Aktivität des ebenfalls Natrium-

abhängigen Glutaminimporters aus *C. glutamicum* (Siewe *et al.*, 1995) zu verschiedenen Zeitpunkten nach einem hyperosmotischen Schock gemessen.

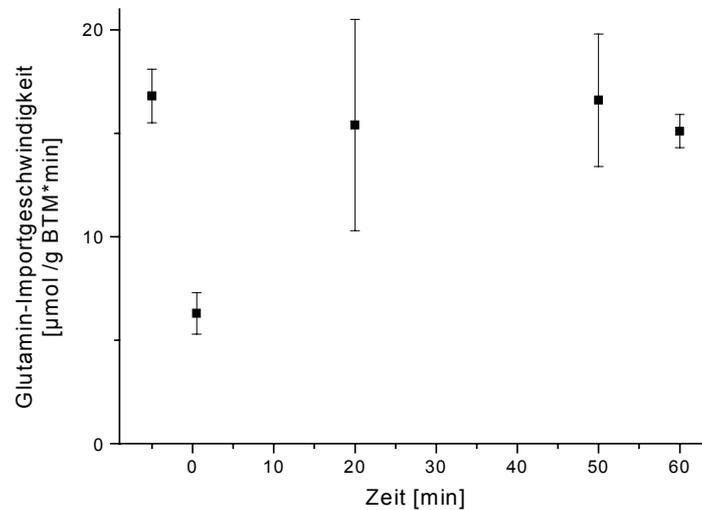


Abbildung 3.3: Glutaminaufnahmegeschwindigkeit in *C. glutamicum* DHPF nach einem hyperosmotischen Schock. Die Zellen wurden in 30°C warmen Puffer überführt, durch Zugabe von 250 mM NaCl von 116 mOsm/kg auf 593 mOsm/kg osmotisch geschockt ($t = -0,5$ min) und mit 0,5 mM Betain als Substrat sowie 25 µg/ml Chloramphenicol versetzt ($t = 0$ min). Zur Aufnahmemessung wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Aliquote abgenommen und auf 0,1 mM [14 C]-Glutamin (Endkonzentration) gegeben. Der Wert bei $t = -5$ min entspricht der Glutaminaufnahme nicht geschockter Zellen, die in warmen Puffer überführt wurden und nach 30 Sekunden mit Glutamin und Betain versetzt wurden.

Die Aktivität des Glutaminimporters war im gesamten Versuchsverlauf etwa konstant, abgesehen von einem Einbruch unmittelbar nach dem hyperosmotischen Schock, also zu dem Zeitpunkt, an dem die BetP-Aktivität in den anderen Versuchen am höchsten war. Insgesamt konnte daher in dem Zeitraum, in dem das Absinken der Betainimportgeschwindigkeit beobachtet wurde, keine dauerhafte Abnahme der ebenfalls vom elektrochemischen Natriumionenpotenzial abhängigen Geschwindigkeit der Glutaminaufnahme festgestellt werden. Ein Zusammenhang der verringerten BetP-Aktivität mit Änderungen im Natriumpotenzial ist daher unwahrscheinlich.

3.1.3 Aktivität von BetP nach plötzlicher Aufhebung hyperosmotischer Bedingungen

In Abschnitt 3.1.1 wurde gezeigt, dass BetP nach der Adaptation an hyperosmotische Bedingungen erneut aktiviert wurde, wenn die Zellen einem zweiten osmotischen Schock ausgesetzt wurden. Die Adaptationsregulation der BetP-Aktivität war reversibel. Ob auch die Aktivierung von BetP nach hyperosmotischem Schock reversibel war, wurde untersucht, indem *C. glutamicum* DHPF-Zellen, die Plasmid-kodiert *betP* exprimierten, für kurze Zeit einem hyperosmotischen Schock ausgesetzt wurden und anschließend Aliquote dieser Suspension durch Verdünnen in Wasser auf die ursprüngliche Osmolarität zurückgeführt wurden. Nach der Verdünnung wurde jeweils sofort die BetP-Aktivität durch Zugabe von [^{14}C]-Betain gemessen.

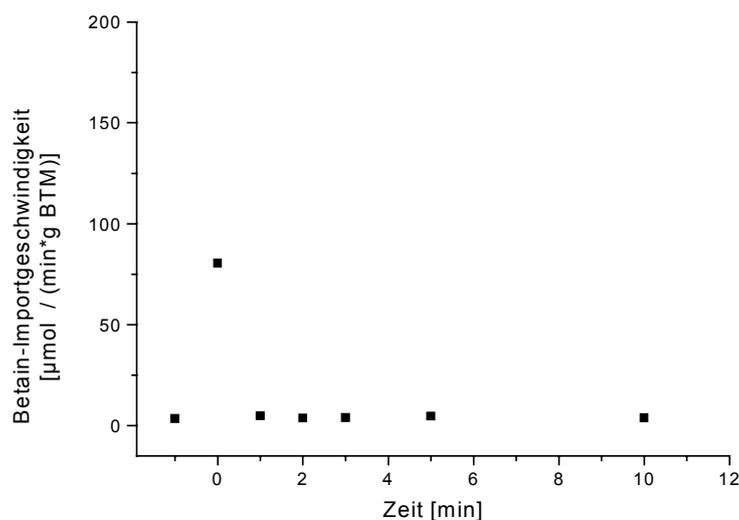


Abbildung 3.4: Betain-Aufnahmegeschwindigkeit nach hyperosmotischem Schock und anschließender Verdünnung in Wasser. Ausgehend von einer basalen Osmolalität von 116 mOsm/kg und einer Temperatur von 4°C, die durch das Waschen der Zellen mit 25 mM KPi 25 mM NaPi pH 7,5 eingestellt wurden, wurden die Zellen in 30°C warmen Puffer mit 593 mOsm/kg überführt, entsprechend 250 mM NaCl zusätzlich zum Puffer. Zu einem Aliquot wurde nach 30 s 0,5 mM [^{14}C]-Betain zugegeben. Die anderen Aliquote wurden nach 1, 2, 3, 5 oder 10 min durch Zugabe des vierfachen Volumens an Wasser verdünnt, sodass die Osmolalität etwa der des niedrigosmolalen Waschpuffers entsprach. Gleichzeitig wurden jeweils 0,5 mM [^{14}C]-Betain als Substrat sowie 25 μg/ml Chloramphenicol zugegeben. Die BetP-Aktivität von Zellen in Waschpuffer wurde ebenfalls gemessen, indem die Zellen in 30°C warmen Waschpuffer überführt wurden (dargestellt bei t = -1 min).

Unmittelbar nach dem hyperosmotischen Schock mit 250 mM NaCl, der eine Osmolalitätsänderung von 116 mOsm/kg auf 593 mOsm/kg bewirkte, zeigte BetP eine Aufnahmegeschwindigkeit von $80,5 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$. Wurde die Zellsuspension nach einem hyperosmotischen Schock in Wasser verdünnt, um die ursprüngliche Osmolalität des Waschpuffers in etwa wieder herzustellen, sank auch die Betainaufnahmegeschwindigkeit auf das Niveau im ungeschockten Zustand zurück. Dabei wurden Geschwindigkeiten zwischen 3 und $5 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$ beobachtet. Die Abnahme der Aktivität konnte nicht durch Mangel an Kosubstrat verursacht worden sein. Nach dem hyperosmotischen Schock waren in der Lösung circa 290 mM Natriumionen vorhanden, von denen Natriumhydrogenphosphat und Natriumdihydrogenphosphat aus dem Puffer bei pH 7,5 circa 40 mM beitrugen und NaCl als Osmolyt zusätzliche 250 mM. Im Anschluss an die Verdünnung waren daher noch etwa 60 mM Natriumionen in der Lösung gegenüber circa 40 mM im Waschpuffer. Der K_M von BetP für Natrium beträgt 4 mM. Die Aktivierung von BetP nach hyperosmotischem Schock war somit reversibel, wenn die hyperosmotischen Bedingungen durch Verdünnung der Zellsuspension mit Wasser aufgehoben wurden.

3.2 BetP-Aktivität und Wachstumsmedium

Um die unterschiedlichen physiologischen Situationen von Zellen, die in Minimalmedium oder Vollmedium gewachsen sind, zu berücksichtigen, wurden Aufnahmemessungen in Zellen durchgeführt, die über Nacht in BHI-Medium kultiviert worden waren. Während in dem verwendeten Minimalmedium Glukose, Ammoniumsulfat und Harnstoff als einzige Quellen für Kohlenstoff und Stickstoff vorhanden waren, standen im Vollmedium zahlreiche Metabolite und andere Solute zur Verfügung. Da die Art des Wachstumsmediums Einfluss auf den Zellstoffwechsel hat (vergleiche Abschnitt 4.3), wurde eine Abhängigkeit der Antwort auf osmotischen Stress von der Wahl des Wachstumsmediums ebenfalls vermutet.

Ein für die Messungen wichtiger Unterschied der beiden Medien ist das Vorhandensein von Betain im BHI-Medium. Es könnte über Nacht auch bei basaler BetP-Aktivität (vergleiche Abschnitt 3.1) in signifikanten Mengen in die Zellen importiert werden. Da die Anwesenheit internen Transportsubstrates bei Interpretation gemessener Transportkinetiken berücksichtigt werden muss, wurde deshalb zunächst mit HPLC bestimmt, welche Menge Betain zu Beginn eines typischen Aufnahmeversuchs in den Zellen vorhanden war, nachdem die Zellen über Nacht in BHI-Medium gewachsen waren und dann hypoosmotisch gewaschen wurden.

3.2.1 Zu Versuchsbeginn vorhandene Menge Betain: Einfluss auf die Gewinnung kinetischer Daten und auf die spezifische Radioaktivität

C. glutamicum-Zellen wurden über Nacht in BHI-Medium kultiviert und anschließend bei 4°C mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 hypoosmotisch gewaschen. Mittels HPLC wurde bestimmt, welche Menge Betain die Zellen nach Übernachtskultur in BHI-Medium akkumuliert hatten, wie viel davon nach der Wäsche in kaltem, hypoosmotischen Puffer noch in den Zellen vorhanden war, oder ob sämtliches Betain während des hypoosmotischen Waschschruttes durch mechanosensitive Kanäle (Ruffert *et al.*, 1997; Nottebrock *et al.*, 2003) aus den Zellen gelangt war.

Tabelle 3.2: Internes Betain nach Übernachtskultur in BHI und nach hypoosmotischer Wäsche bei 4°C in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5. Angabe zum Zellvolumen aus Abbildung 3.8 entnommen.

Messbedingung	Betain [$\mu\text{mol/g BTM}$]	Zellvolumen [$\mu\text{l/mg BTM}$]	Betain [mM]
Übernachtskultur aus BHI-Medium	252 (n=1)	nicht bestimmt	nicht errechnet
Nach dem Waschen	133 \pm 13 (n=5)	1,62 \pm 0,09 (n=4)	83 \pm 15

Nach Übernachtskultur in BHI-Vollmedium wurde eine Menge von 252 $\mu\text{mol/g BTM}$ gemessen. Diese Daten stehen im Einklang mit der Beobachtung aus Abschnitt 3.1, dass ohne hyperosmotischen Schock nach 1 h knapp 200 $\mu\text{mol Betain/g BTM}$ importiert worden waren und zu diesem Zeitpunkt nur noch sehr geringer Betainimport stattfand. Da *C. glutamicum* nicht in der Lage ist, Betain zu synthetisieren (Farwick *et al.*, 1995), musste auch die in diesem Experiment detektierte Menge Betain durch BetP in die Zelle importiert worden sein. Die hypoosmotische Wäsche mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 bewirkte den Ausstrom etwa der Hälfte des vorhandenen Betains. Nach wie vor war damit eine signifikante Menge Betain in den Zellen vorhanden. Für Aufnahmeexperimente mit in BHI gewachsenen Zellen musste daher berücksichtigt werden, dass bei intrazellulär vorhandenem Betain die gemessene initiale Aufnahmegeschwindigkeit zwar mit der BetP-Aktivität übereinstimmt, aber bei einem möglichen, gleichzeitigen Betainexport nicht der Nettoaufnahme von Betain entspricht. Weiterhin musste geklärt werden, was mit der intern zu Versuchsbeginn vorhandenen Menge Betain passierte, da sie entweder mit extern zugegebenem Betain

äquilibrieren oder während des gesamten Versuches in der Zelle verbleiben konnte. Die Frage einer möglichen Äquilibration der internen und externen Menge Betain während des Versuches wird in Abschnitt 3.2.3 behandelt.

Die während des Wachstums von den Zellen akkumulierte Menge an Betain war klein gegenüber der Menge Betain, die zu Beginn der Aufnahmeversuche extern zugegeben wurde. In einem typischen Experiment lag eine Zelldichte von 0,1 mg BTM / ml vor. In einem Ansatz von 1 ml bewirkte dies eine Einführung von 13 nmol Betain, entsprechend weniger als 3 % von 500 nmol, die 1 ml einer 0,5 M Lösung enthielt. Eine signifikante Beeinflussung der gesamten in einem Experiment vorhandenen Menge Betain und damit der eingestellten spezifischen Radioaktivität konnte daher ausgeschlossen werden.

3.2.2 Betain-Aufnahme von in BHI kultivierten Zellen

Analog zu den Aufnahmeversuchen in MM1-Medium wurde die Betainaufnahme nach einem hyperosmotischen Schock bei Zellen untersucht, die in BHI-Medium gewachsen waren.

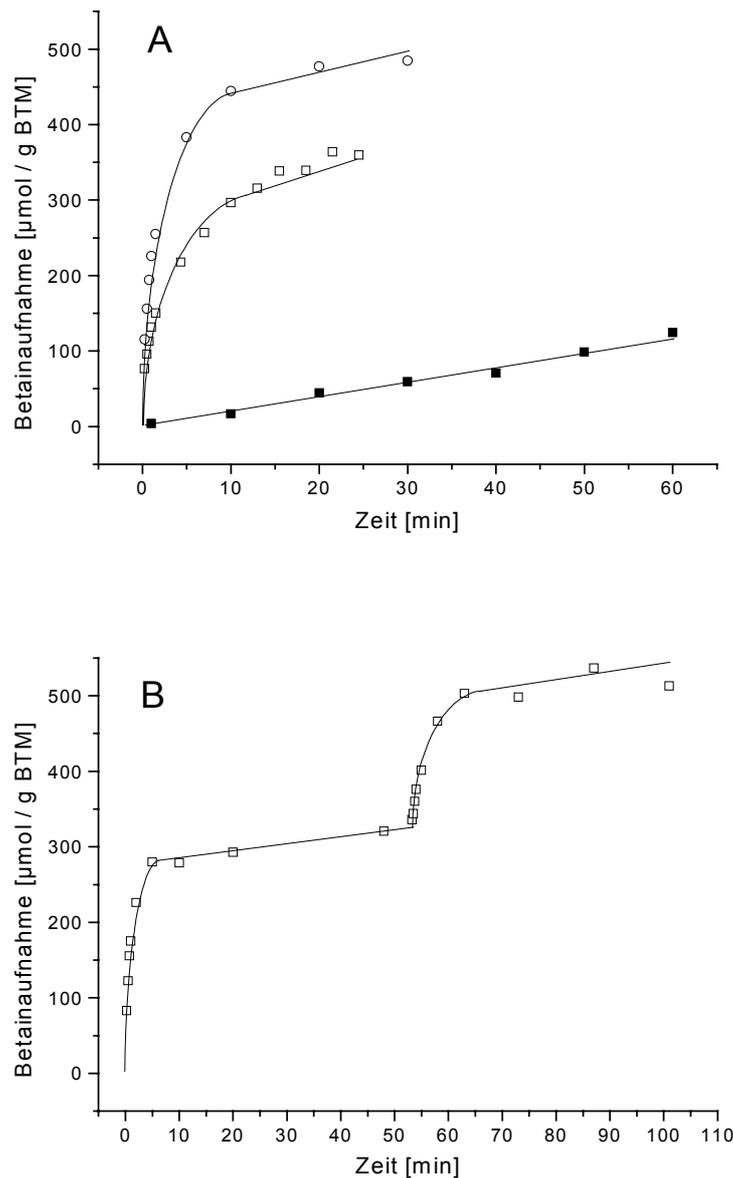


Abbildung 3.5: Aufnahme von Betain durch BetP ohne und mit hyperosmotischem Schock nach Wachstum in BHI-Medium. A: Ausgehend von einer basalen Osmolarität von 116 mOsm/kg und einer Temperatur von 4°C wurden die Zellen in 30°C warmen Puffer der gleichen Osmolarität (geschlossene Quadrate), mit 593 mOsm (offene Quadrate) oder 897 mOsm (offene Kreise) überführt, entsprechend einer Addition von 250 oder 400 mM NaCl. Nach 30 s wurden 0,5 mM [^{14}C]-Betain als Substrat sowie 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Chloramphenicol zugegeben. B: Zellen, die durch Zugabe von 250 mM NaCl von 116 mOsm/kg auf 593 mOsm/kg geschockt wurden, wurden nach 51 min einem weiteren hyperosmotischen Schock mit 490 mM NaCl auf 1564 mOsm/kg unterzogen.

Prinzipiell zeigten in BHI gewachsene Zellen das gleiche Regulationsverhalten wie in MM1 gewachsene Zellen. Auch hier wurde für 5 bis 10 Minuten schneller Betainimport beobachtet, gefolgt von einer Phase langsamen Imports. Jedoch war die gemessene Initialgeschwindigkeit mit 72 und $157 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$ nach hyperosmotischen Schocks mit 250 oder 400 mM NaCl höher als im Vergleichsansatz in MM1-Medium gewachsener Zellen. Sie repräsentiert aber im Gegensatz zu der in Zellen aus MM1-Medium gemessenen Aktivität nicht notwendigerweise die Nettoimportgeschwindigkeit, da für in BHI gewachsene Zellen theoretisch gleichzeitig Betainexport stattfinden kann (vergleiche Abschnitte 3.2.1, 3.2.3).

Ungeschockte Zellen zeigten eine kontinuierliche Aufnahme von $2 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$ und nicht wie in MM1 gewachsene Zellen eine leicht erhöhte Aufnahme kurz nach der Betainzugabe. Die Vorbeladung mit Betain während der Anzucht wirkte sich hier also besonders stark aus. Ein zweiter hyperosmotischer Schock führte auch bei in BHI gewachsenen Zellen zur sofortigen, erneuten, wenige Minuten andauernden Aktivierung, der eine Phase geringer Nettoimportaktivität folgte.

3.2.3 Äquilibrierung der internen und externen Betainmenge

In BHI gewachsene Zellen enthielten zu Versuchsbeginn bereits signifikante Mengen Betain (Abschnitt 3.2.1). Dies führte dazu, dass zu Beginn der Experimente zwei Betainmengen mit verschiedener spezifischer Radioaktivität existierten: die interne unmarkierte Betainmenge und die extern zugegebene mit einer eingestellten spezifischen Radioaktivität. Zur genauen Interpretation von Aufnahmeversuchen mit vorbeladenen Zellen gehört die Klärung der Frage, ob die zu Versuchsbeginn intern vorhandene Menge Betain mit der extern zugegebenen Menge äquilibriert oder nicht.

In einem hypothetischen System, in dem lediglich Betainimport und kein Export aus der Zelle möglich ist, vermischen sich die beiden Betainmengen intern, aber nicht extern. Bei unmarkiert vorbeladenen Zellen bliebe daher die spezifische Radioaktivität der extern zugegebenen Betainmenge konstant, während sich intern durch die Vermischung der spezifisch radioaktiv markierten Betainmenge mit der dann vergleichbar großen Menge des intern bereits vorher vorhandenen Betains eine undefinierte spezifische Radioaktivität einstellte. Dann könnte die interne Betainmenge für in BHI-Medium gewachsene Zellen nur dann eindeutig mit Aufnahmemessungen bestimmt werden, wenn die intern zu Versuchsbeginn vorhandene Menge bekannt ist, was durch HPLC-Messung geschehen könnte. Genau bestimmbar wären dagegen die Menge des während des Versuchs importierten

Betains sowie zu jeder Zeit die Netto-Importgeschwindigkeit, da in diesem hypothetischen System der Export von Betain ausgeschlossen wäre.

Ist dagegen Export möglich, so kann es sowohl extern als auch intern zu einer Vermischung der Betainmengen kommen. Dabei hänge Ausmaß und Geschwindigkeit der Äquilibrierung von der Menge des intern zu Versuchsbeginn vorhandenen Betains sowie den Geschwindigkeiten von Export und Import ab. Die eingestellte spezifische Radioaktivität des extern zugegebenen Substrates verringerte sich dann entsprechend der Vermischung mit dem unmarkierten, durch die Zellen eingeschleppten Substrat. Im vorliegenden System war die Menge des durch die Zellen in den Versuch mitgeschleppten unmarkierten Betains etwa 35-Mal kleiner als die des zu Versuchsbeginn addierten spezifisch markierten Betains (vergleiche Abschnitt 3.2.1). Dies würde bei einer vollständigen Äquilibrierung der Betainmengen lediglich zu einer geringfügigen Abnahme der spezifischen Radioaktivität im Gesamtsystem führen. Von dieser Abweichung abgesehen, könnte dann aber auch die interne Betainmenge nach der Äquilibrierung genau bestimmt werden. Eine nur teilweise Äquilibrierung der Betainmengen während des Versuches würde dagegen eine Interpretation der gewonnenen Daten erschweren.

Die Situation wurde wie folgt experimentell erfasst: Nach einem osmotischen Schock wurde [^{14}C]-Betain zugegeben. Eine Minute nach der Zugabe von [^{14}C]-Betain wurde trägerfreies [^3H]-Betain zugegeben. Zu diesem Zeitpunkt befand sich bereits eine erhebliche Menge an [^{14}C]-Betain in den Zellen (vergleiche Abbildung 3.5). Im Falle eines möglichen Austausches der intrazellulären und extrazellulären Betainmenge durch Export und Neuaufnahme wäre zu erwarten, dass die erste und zweite Markierung intrazellulär nach einiger Zeit gleichwertig, also mit gleicher spezifischer Radioaktivität vorhanden wären. Ohne die Möglichkeit des Exportes wäre die zweite Markierung dauerhaft geringer in den Zellen vorhanden als die erste. Um zwei verschiedene Situationen zu erfassen, wurde die zweite Markierung in einem weiteren Versuch erst 5 Minuten nach der ersten Markierung zugegeben. Zur Vermeidung einer Verfälschung der Ergebnisse durch radiochemische Unreinheiten der markierten Substanzen wurde weiterhin jeder der zwei Versuche je einmal mit [^{14}C]-Betain und einmal mit [^3H]-Betain gestartet und der Durchschnittswert der beiden Experimente aufgetragen. Zur quantitativen Beurteilung der Vermischung der spezifischen Markierungen wurde ein Durchmischungsquotient definiert, der den Quotienten aus Messwerten der Radioaktivität der ersten und zweiten Markierung in den Zellen darstellt und unter der Annahme konstanter externer spezifischer Radioaktivität beider Markierungen ein Maß der Äquilibrierung beider Betainmengen darstellt. Der Wert des Durchmischungsquotienten ist 0, wenn die zweite

Markierung nicht in der Zelle gemessen werden kann, und 1, wenn beide Isotope gleichwertig intrazellulär vorhanden sind. Die Messwerte wurden jeweils auf die gesamte zugegebene Menge Radioaktivität der beiden Isotope normiert.

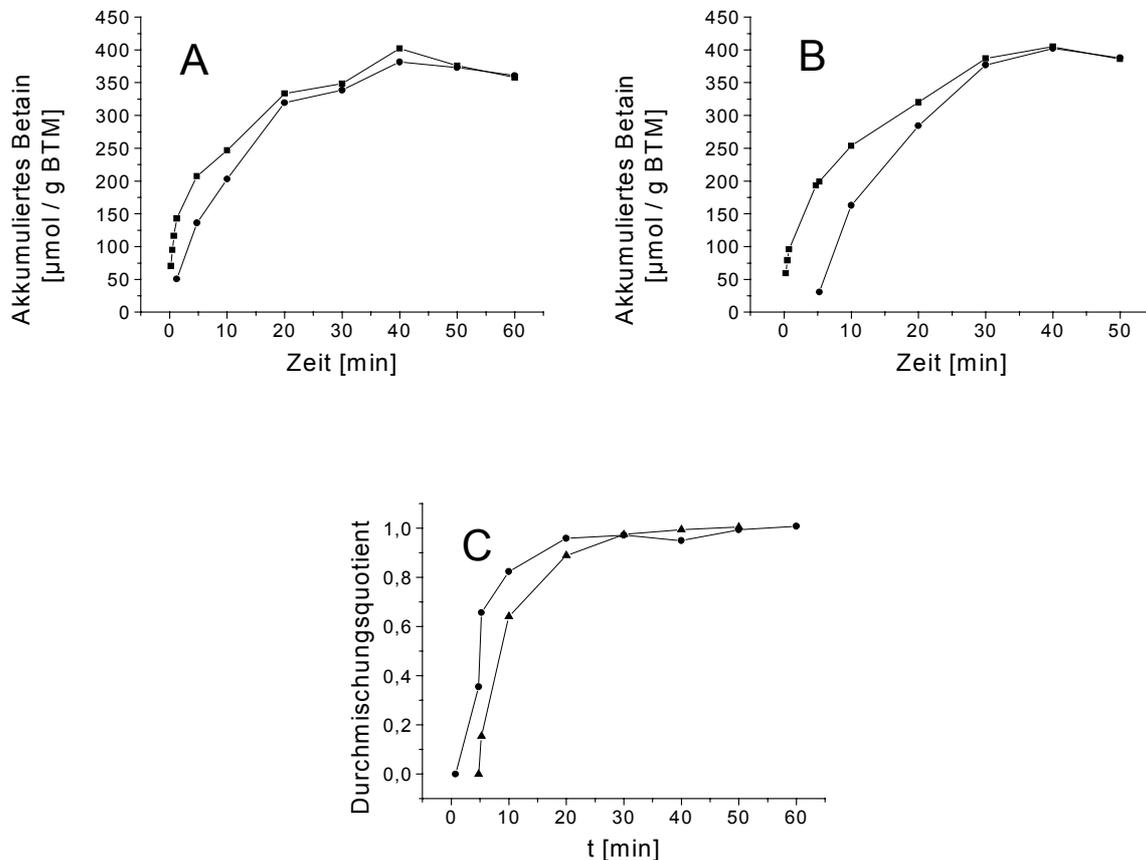


Abbildung 3.6: Äquilibration zweier Betainmengen. Die Zellen wuchsen über Nacht in BHI-Medium, wurden mit 50 mM KPi pH 7,5 gewaschen und durch Zugabe von 400 mM NaCl von 116 mOsm/kg auf 593 mOsm/kg hyperosmotisch geschockt. Nach 30 s wurden 0,5 mM markiertes [^{14}C]- oder [^3H]-Betain sowie 25 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol zugegeben (Quadrate). Nach 1 min (A) oder 5 min (B) wurde die jeweils andere Markierung trägerfrei zugegeben (Kreise). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus zwei Experimenten, bei denen je einmal [^{14}C]- und einmal [^3H]-Betain als erste Markierung diente. (C) Durchmischungsquotient zweier verschiedener Markierungen. Es wurde der Quotient der gemessenen Radioaktivität der ersten und zweiten Markierung in den Zellproben errechnet. Die zweite Markierung wurde 1 min (Kreise) oder 5 min (Dreiecke) nach der ersten Markierung zugegeben. Der Quotient kann zwischen den Werten 0 (zweite Markierung nicht in der Zelle) und 1 (erste und zweite Markierung gleichwertig in der Zelle) annehmen.

Die Aufnahmekinetiken der ersten Markierungen zeigten in beiden Ansätzen die typische schnelle Betainaufnahme nach dem hyperosmotischen Schock, gefolgt von einer Phase langsamer Betainaufnahme. Wurde die zweite Markierung eine Minute nach der ersten Markierung zugegeben (siehe Abbildung 3.5a,c), so war sie nach 20 Minuten genauso zwischen dem Zellinneren und der Lösung verteilt wie diese. Wurde die zweite Markierung nach

5 Minuten zugegeben (Abbildung 3.5b,c), konnte die gleiche Verteilung der Markierungen zwischen externem und internem Kompartiment nach 30 Minuten beobachtet werden.

Das Ergebnis zeigte, dass ein Austausch zwischen externer und interner Betainmenge stattfinden musste, da anderenfalls die zweite Markierung immer zu einer geringeren Teilmenge im inneren Kompartiment vorliegen müsste als die erste. Folglich musste es während der Anpassung an osmotischen Stress auch Export von Betain geben.

Die Experimente mit zwei verschiedenen Markierungen ließen sich auf die Situation übertragen, die zu Beginn eines Experimentes mit in BHI gewachsenen Zellen herrschte. Dort gab es statt der Markierung mit zwei verschiedenen radioaktiven Isotopen eine kleine unmarkierte interne Betainmenge und eine größere markierte externe. Für alle Versuche mit in BHI-Medium gewachsenen Zellen wurde daher davon ausgegangen, dass die zu Versuchsbeginn vorhandene Betainmenge ebenfalls nach 20 Minuten mit dem zugegebenen Betain äquilibriert war. Somit repräsentierten Messwerte 20 Minuten oder länger nach Versuchsbeginn die tatsächlich in der Zelle vorhandenen Betainmengen.

3.3 Charakterisierung der Betainflüsse: Import und Export von Betain

Das im vorigen Abschnitt beschriebene Experiment wies bereits auf die Möglichkeit des Betainexportes während der Adaptation an hyperosmotischen Stress hin. Zur näheren Charakterisierung dieser Antwort auf osmotischen Stress wurden Import und Export von Betain in mehreren repräsentativen Situationen näher untersucht: vor dem ersten osmotischen Schock, unmittelbar nach dem ersten osmotischen Schock, während der Adaptationsphase nach dem ersten osmotischen Schock und unmittelbar nach dem zweiten hyperosmotischen Schock. Zur genauen Beschreibung der Import- und Exportflüsse von Betain wurden Doppelmarkierungsexperimente mit [^{14}C]- und [^3H]- markierten Betainmolekülen durchgeführt.

Die nach Zugabe radioaktiv markierter Substanzen gemessene Aufnahme dieser durch die Zellen muss je nach experimenteller Situation verschieden interpretiert werden. Der gemessene Wert der Substrataufnahme entspricht nur dann der gesamten Aufnahme des Substrates seit dem Beginn des Experimentes, wenn zum Zeitpunkt der Messung kein internes Substrat vorhanden ist. Bei Anwesenheit internen Substrates, sei es durch eingeschlepptes Substrat bei Wachstum in BHI-Medium oder durch während des Versuches aufgenommenes Substrat,

kann zeitgleich zum Import auch Export stattfinden. Im vorliegenden System stünden für den Betaintransport eine Gegentauschaktivität von BetP, die ein Charakteristikum sekundärer Transporter ist, mechanosensitive Kanäle (Ruffert *et al.*, 1997; Nottebrock *et al.*, 2003) oder ein bisher nicht bekannter und nicht vermuteter Exportcarrier für Betain zur Verfügung. Für eine Situation mit gleichzeitig auftretendem Import und Export können prinzipiell drei verschiedene Stoffflüsse definiert werden: unidirektionaler Import, unidirektionaler Export und der Nettofluss, die Summe aus den vorgenannten Flüssen.

Der Nettofluss kann zu Versuchsbeginn über eine eingeführte radioaktive Markierung nachvollzogen werden, wenn zu diesem Zeitpunkt kein Betain in den Zellen ist. Er entspricht in diesem Fall dem unidirektionalen Import. Ist zu Versuchsbeginn bereits Substrat in den Zellen vorhanden, so repräsentiert die Markierung zu Versuchsbeginn nur den unidirektionalen Import und erst dann den Nettofluss, wenn die interne und externe Menge Substrat äquilibriert ist (vergleiche Abschnitt 3.2.3). Dies ist bei in BHI gewachsenen Zellen nach circa 20 Minuten der Fall. Bei in MM1-Medium gewachsenen Zellen existiert das Problem nicht, da im Minimalmedium keine Vorbeladung mit Betain möglich ist und *C. glutamicum* kein Betain synthetisieren kann. Der unidirektionale Import kann weiterhin jeweils für diskrete Zeitpunkte durch Einführung einer zweiten radioaktiven Markierung zu einem Aliquot der Zellsuspension festgestellt werden. Können für einen Zeitpunkt sowohl Nettofluss als auch unidirektionaler Import bestimmt werden, so kann aus der Differenz der unidirektionale Efflux berechnet werden. Diese Methode zur Bestimmung der transmembranen Stoffflüsse ist experimentell der der Zugabe eines Überschusses externen unmarkierten Substrates vorzuziehen, da sie nicht in die kinetischen Bedingungen im System eingreift.

Zusätzlich zu den Flussparametern v_{up} für unidirektionalen Influx, entsprechend der Gesamtaktivität von BetP, v_{net} für den Netto-Influx und $v_{ef} = v_{up} - v_{net}$ für den unidirektionalen Efflux wurde der Parameter v_{ef}/v_{up} definiert. v_{ef}/v_{up} zeigt an, welcher rechnerische Anteil des importierten Betains wieder aus der Zelle gelangt. Der Wert des Parameters kann zwischen 0 (reine Aufnahme) und 1 (Export gleicht Aufnahme völlig aus oder vollständiger Gegentausch durch BetP) schwanken.

Tabelle 3.3: Transmembran-Betainflüsse in verschiedenen Phasen osmotischer Aktivierung von *C. glutamicum* DHPF pGTG (*betP*).

Medium	Situation im Experiment (Zeitraum der Messung)		Osmolalität [mOsm/kg]	v_{net}	v_{up}	v_{ef}	v_{ef}/v_{up}	
				[$\mu\text{mol min}^{-1} \text{g BTM}^{-1}$]				
MM I	I	ungeschockt, Anfangsphase (0 – 5 min)	116 (konstant)	= v_{up}	6.4 ± 0.8	0.0**	0.0**	
		ungeschockt, Adaptationsphase (40 – 60min)	116 (konstant)	1.4 ± 0.2	3.6 ± 0.9	2.2 ± 1.1	0.61*	
	II	erster osmotischer Schock (0 – 45sec)	116 → 593	= v_{up}	62.1 ± 8.2	0.0**	0.0**	
		erster osmotischer Schock (0 – 45sec)	116 → 897		102 ± 12			
		erster osmotischer Schock (0 – 45sec)	116 → 1086		111 ± 4			
		erster osmotischer Schock (0 – 45sec)	116 → 1564		102 ± 30			
	III	Adaptationsphase (40 – 60 min)	593 (konstant)	3.2 ± 0.4	17.2 ± 1.0	14.0 ± 1.5	0.81*	
		Adaptationsphase (40 – 60 min)	897 (konstant)	2.3 ± 1.1	n.g.	n.g.	n.g.	
		Adaptationsphase (40 – 60 min)	1086 (konstant)	3.1 ± 1.8	10.6 ± 3.1	7.4 ± 4.9	0.70*	
		Adaptationsphase (40 – 60 min)	1564 (konstant)	3.0 ± 1.9	n.g.	n.g.	n.g.	
	IV	zweiter osmotischer Schock (51.25 – 52min)	593 → 1564	17.1 ± 4.3	48.2 ± 11.8	31.2 ± 16.1	0.65 ± 0.07	
	BHI	I	ungeschockt (10 – 30min)	116 (konstant)	n.d.	2.0 ± 0.7	n.d.	n.d.
		II	erster osmotischer Schock (0 – 45sec)	116 → 593	n.d.	72.4 ± 2.7	n.d.	n.d.
erster osmotischer Schock (0 – 45sec)			116 → 897	n.d.	157 ± 0.2	n.d.	n.d.	
III		Adaptationsphase (15 – 25 min)	593 (konstant)	3.9 ± 1.0	14.8 ± 1.9	10.9 ± 2.9	0.74*	
		Adaptationsphase (10 – 30 min)	897 (konstant)	2.2 ± 0.2	n.m.	n.m.	n.m.	
IV		zweiter osmotischer Schock (20 – 21min)	593 → 1086	33.1 ± 17.6	111 ± 8	78 ± 25.2	0.70 ± 0.28	
	zweiter osmotischer Schock (20 – 21min)	593 → 1564	64.5 ± 7.6	168 ± 13	104 ± 21	0.62 ± 0.17		

Daten teilweise aus Abbildung 3.1 und Abbildung 3.5. Die angegebenen Werte für die Geschwindigkeit repräsentieren die Steigung einer Geraden durch die ersten drei Messwerte nach dem jeweiligen hyperosmotischen Schock, entsprechend 15, 30 und 45 Sekunden nach Zugabe des Osmolyten.

* Keine Fehlerangaben bei v_{ef}/v_{up} in der Adaptationsphase, da die Addition der vergleichsweise hohen relativen Fehler bei geringen Geschwindigkeiten hohe Fehlerwerte für v_{ef}/v_{up} liefern würde.

** Zellen aus Minimalmedium können zu Versuchsbeginn kein Betain enthalten, daher ist kein Efflux zu Versuchsbeginn möglich.

n.d. = nicht definiert, da zu Versuchsbeginn Efflux vorhandenen, unmarkierten Betains möglich, aber nicht messbar.

n.g. = Parameter wurde nicht gemessen.

Ohne hyperosmotischen Schock wurde, wie bereits beschrieben, nur eine geringe initiale Betainimportgeschwindigkeit v_{net} von $6,4 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$ beobachtet, die im Verlauf des Experiments auf $1,4 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$ sank (vgl. Abbildung 3.1). Nach hyperosmotischen Schocks wurden, je nach Stärke des hyperosmotischen Schocks und Wachstumsmedium der Zellen, Importgeschwindigkeiten v_{net} zwischen $62,1$ und $157 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$ gemessen. In der jeweils darauf folgenden Phase der Adaptation sank die Nettoimportgeschwindigkeit auf Werte um $3 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$. Die abnehmende Geschwindigkeit des Nettoimportes während der Adaptation an hyperosmotische Bedingungen hatte zwei Ursachen: zum einen war die unidirektionale Betain-Aufnahmegeschwindigkeit v_{up} reduziert und nahm Werte zwischen 10 und $20 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$ an, zum anderen wurde Efflux von Betain beobachtet.

Bei einem zweiten hyperosmotischen Schock von 593 auf 1564 mOsm/kg wurden bei Zellen aus Minimalmedium ein unidirektionaler Import von $48,2 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$ und ein Nettoimport von $17,1 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$ gemessen. In Zellen aus Vollmedium waren sowohl der unidirektionale Import als auch der Nettoimport in dieser Situation mit $168 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$ und $64,5 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$ erheblich schneller. Beide Male konnten somit auch unmittelbar nach einem hyperosmotischen Schock unterschiedliche Geschwindigkeiten von unidirektionalem Import und Nettoaufnahme beobachtet werden. Diese Diskrepanz, die in allen Situationen auftrat, in denen sowohl v_{net} als auch v_{up} gemessen wurde, lässt sich nur durch die in Abschnitt 3.2.3 bereits postulierte Existenz entweder gleichzeitigen Imports und Exports oder BetP-vermittelten Gegentauses erklären.

Auffällig war, dass der Anteil des Effluxes an der Gesamtaktivität ($v_{\text{ef}}/v_{\text{up}}$) mit Werten um 0,7 relativ konstant war, unabhängig von der Situation, für die der Wert jeweils berechnet wurde. Somit wurde mehr als die Hälfte der importierten Stoffmenge Betain wieder aus der Zelle hinaus befördert. Besonders interessant war dieser Aspekt in der Situation des zweiten hyperosmotischen Schocks: Wie erwartet, konnte eine sofortige Steigerung der Nettoimportgeschwindigkeit v_{net} gemessen werden. Die v_{up} -Werte, die die eigentliche Geschwindigkeit von BetP darstellen, waren nach dem zweiten hyperosmotischen Schock ebenfalls stark erhöht. Rechnerisch ergab sich folglich ebenso ein starker Anstieg der Effluxgeschwindigkeit v_{ef} . Der Parameter $v_{\text{ef}}/v_{\text{up}}$, der den Anteil des Effluxes am gesamten Betainimport darstellt, blieb auch nach dem zweiten hyperosmotischen Schock relativ konstant.

3.4 Regulatorische Stimuli von BetP während der Adaptation

In den vorangegangenen Kapiteln wurde festgestellt, dass die Aktivität von BetP während der Anpassung an den hyperosmotischen Stress sinkt. Die Ursache dieser Regulation kann vielfältig sein, da Proteine viele verschiedenartige Stimuli wahrnehmen können, deren Status sich im Laufe der Anpassung an osmotischen Stress ändern kann (Wood, 1999). Viele mögliche Parameter, deren Änderung ein Protein nach einem hyperosmotischen Schock theoretisch als Stimulus wahrnehmen kann, können nach der Anpassung an den hyperosmotischen Schock wieder in den vorherigen Zustand gelangen.

Es wurde untersucht, ob Änderungen der BetP-Aktivität während der Adaptation an osmotischen Stress mit Änderungen der intrazellulären Konzentrationen der als Stimulus zur BetP-Aktivierung beschriebenen Kaliumionen (Rübenhagen *et al.*, 2001) sowie des Substrates

Betain zusammen hingen. In diesem Rahmen wurde auch die Adaptationsregulation der Mutante BetP Δ 25 untersucht, die auch ohne vorhergehenden osmotischen Stress Betain aufnimmt und daher hinsichtlich ihrer Aktivierung dereguliert ist (Peter *et al.*, 1998a; Schiller *et al.*, 2004b). Weiterhin wurde die BetP-Aktivität in Zellen untersucht, die nicht durch Betainaufnahme, sondern nur durch Synthese anderer kompatibler Solute an den osmotischen Stress adaptieren konnten. Um spezie-spezifische Einflüsse auf die Regulation von BetP zu untersuchen, wurde die Aktivität des Proteins nach heterologer Expression von *betP* in *E. coli* untersucht.

3.4.1 Rolle von Kalium bei der Regulation von BetP

Die interne Kaliumkonzentration wurde zu verschiedenen Zeitpunkten vor dem hyperosmotischen Schock, kurz nach dem hyperosmotischen Schock und während der Adaptationsphase gemessen. Dazu war neben der Bestimmung der internen Kaliummenge durch Flammenfotometrie auch die Bestimmung des Cytoplasmavolumens erforderlich, um Konzentrationen an Kalium errechnen zu können. Die Bestimmung von Volumen und Kalium erfolgten sowohl für Zellen, die über Nacht in Minimalmedium gewachsen waren, als auch für Zellen, die über Nacht in Vollmedium kultiviert wurden.

3.4.1.1 Kaliumkonzentration und Volumen nach hyperosmotischem Schock: Zellen aus MM1-Medium

Zur Bestimmung von interner Kaliummenge, Kaliumkonzentration und Zellvolumen wurden die Zellen der gleichen Waschprozedur unterzogen wie vor den Aufnahmemessungen. Da mehr Zellmaterial benötigt wurde als für Aufnahmemessungen, wurde jedoch eine größere Zelldichte eingestellt, damit die Probenvolumina weiterhin einfach handhabbar blieben. Die Betainkonzentration wurde ebenfalls erhöht, um ein signifikantes Absinken der externen Betainkonzentration durch Import in die Zellen zu vermeiden. Hyperosmotische Schocks in verschiedenen Intensitäten analog zu den Aufnahmeversuchen wurden appliziert. Nach Bestimmung der internen Kaliummenge und des Zellvolumens konnten die Werte für die interne Kaliumkonzentration errechnet werden. Da das Zellvolumen nach der Methode von Rottenberg (1979) mit Taurin als für die Zellmembran von *C. glutamicum* impermeablen Solut und Wasser als permeablem Solut bestimmt wurde, müsste man korrekter Weise vom

Volumen freien cytoplasmatischen Wassers sprechen. Die Teilung zellulären Kaliums in gebundenes und verfügbares Kalium konnte mit der gewählten Methode der Kaliumbestimmung durch Flammenfotometrie nicht experimentell erfasst werden. Daher bleiben eventuelle Konzentrationseffekte durch Dissoziation und Bindung von Kalium an Makromoleküle unberücksichtigt.

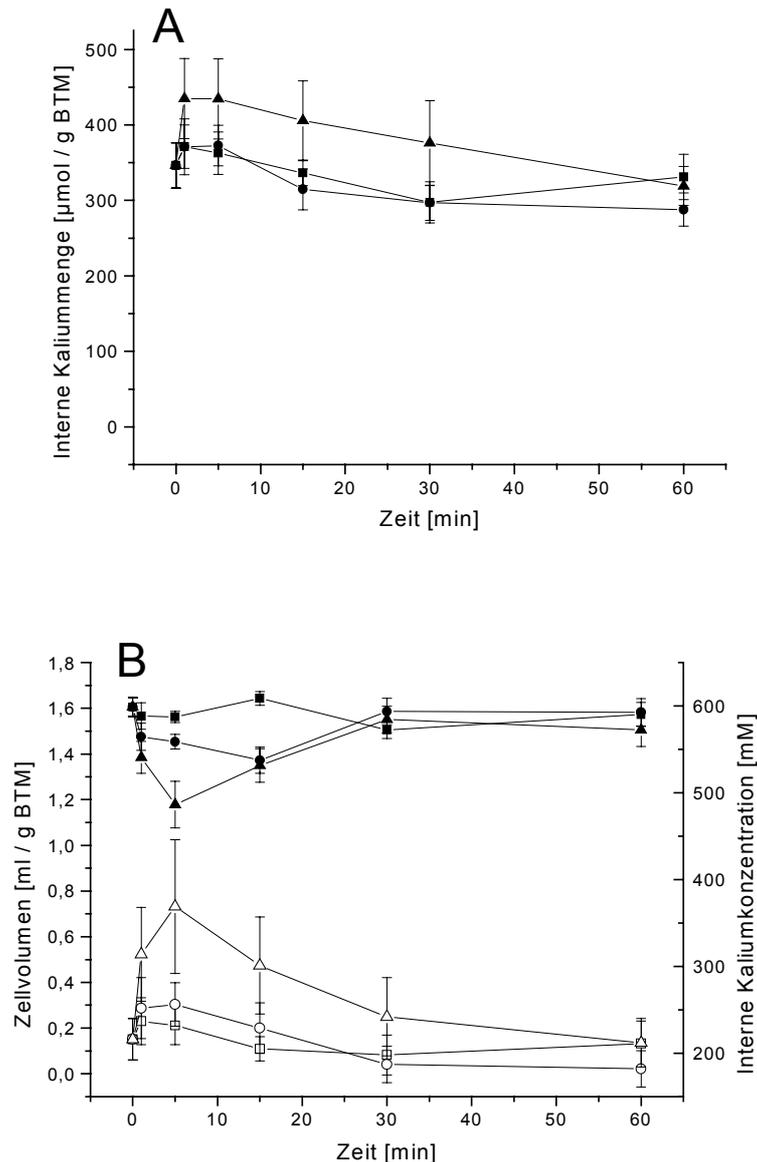


Abbildung 3.7: Interne Kaliummenge (A) sowie internes Volumen (B; geschlossene Symbole) und interne Kaliumkonzentration (B; offene Symbole) nach Wachstum über Nacht in MM1-Minimalmedium. Die Zellen wurden in niedrigosmolalem Puffer gewaschen (116 mOsm/kg) und einem hyperosmotischen Schock mit 250, 400 oder 740 mM NaCl ausgesetzt, entsprechend 593, 897 und 1564 mOsm/kg (Quadrate, Kreise und Dreiecke) nach dem Schock. 30 s nach dem hyperosmotischen Schock wurden 2 mM Betain als Substrat sowie 25 µg/ml Chloramphenicol zugegeben.

Abbildung 3.7 zeigt Kaliummenge, Kaliumkonzentration und das Zellvolumen nach verschiedenen starken hyperosmotischen Schocks von 116 mOsm/kg auf 593, 897 oder 1564 mOsm/kg. In allen Fällen konnte ein Anstieg der intrazellulären Kaliumkonzentration beobachtet werden, der jedes Mal sowohl auf die Aufnahme von Kalium als auch auf eine Verkleinerung des Volumens zurückgeführt werden konnte. Dieser Effekt war bei den verschiedenen stark applizierten hyperosmotischen Schocks in unterschiedlicher Ausprägung zu sehen. Ein hyperosmotischer Schock auf 593 mOsm/kg hatte nur eine geringe Veränderung der Kaliumkonzentration von 216 mM auf 237 mM zum Zeitpunkt einer Minute nach dem hyperosmotischen Schock zur Folge. Das Volumen verringerte sich kaum von 1,61 ml (g BTM)⁻¹ auf 1,56 ml (g BTM)⁻¹ nach 5 Minuten. Nach 15 Minuten waren jeweils die Werte vor dem hyperosmotischen Schock erreicht. Der Schock auf 897 mOsm/kg führte zu mäßigen Änderungen bei der internen Kaliumkonzentration von 216 auf 252 mM nach einer Minute und 256 mM nach 5 Minuten und beim Volumen von 1,61 ml (g BTM)⁻¹ auf 1,37 ml (g BTM)⁻¹ nach 15 Minuten. Nach 30 Minuten zeigten auch in diesem Falle Volumen und Kaliumkonzentration die gleichen Werte wie vor dem hyperosmotischen Schock.

Die deutlichsten Effekte waren beim hyperosmotischen Schock auf 1563 mOsm/kg zu sehen. Die Kaliumkonzentration stieg binnen 5 Minuten von 216 auf 369 mM und das Volumen sank von 1,61 ml (g BTM)⁻¹ auf 1,17 ml (g BTM)⁻¹. 30 Minuten nach dem hyperosmotischen Schock war das Volumen vor dem hyperosmotischen Schock wieder erreicht, und nach 60 Minuten traf dies auch für die Kaliumkonzentration zu.

3.4.1.2 Kaliumkonzentration und Volumen nach hyperosmotischem Schock: Zellen aus BHI-Medium

Um die teilweise unterschiedlich starken Osmostress-Antworten von Zellen, die in Minimalmedium oder Vollmedium gewachsen waren, besser beurteilen zu können, wurde auch die Kalium- und Volumenantwort in Zellen untersucht, die in Vollmedium gewachsen waren.

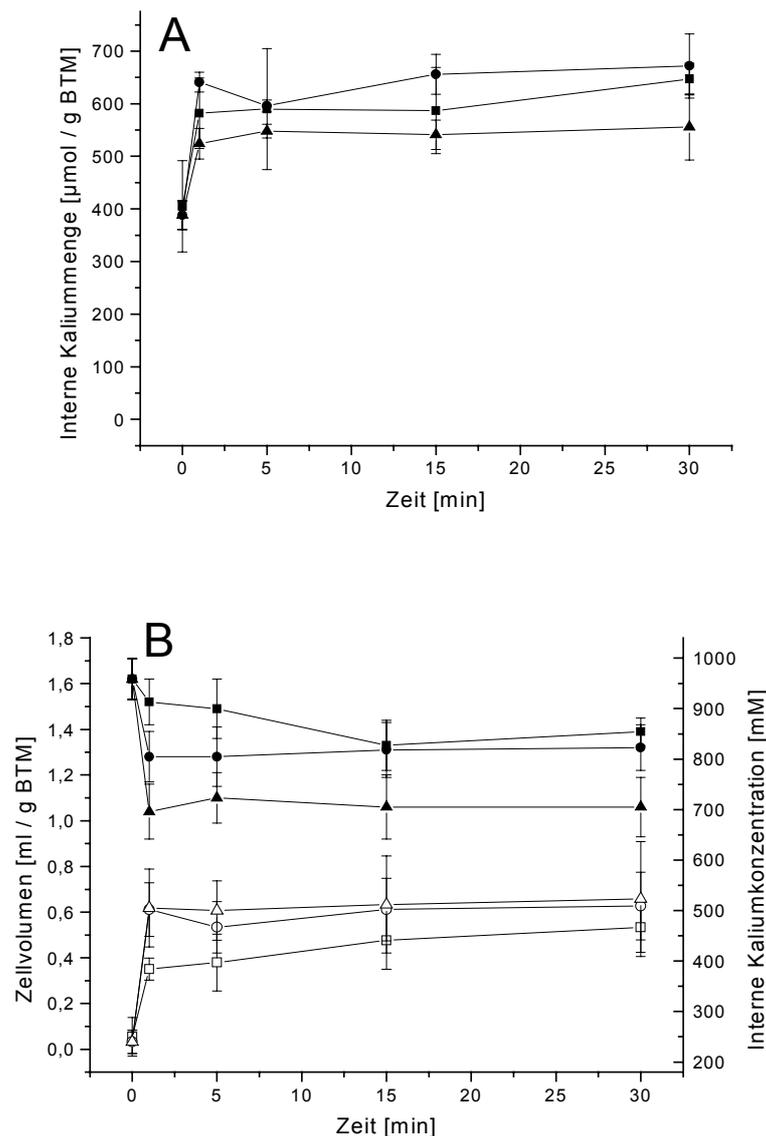


Abbildung 3.8: Interne Kaliummenge (A) sowie internes Volumen (B; geschlossene Symbole) und interne Kaliumkonzentration (B; offene Symbole) nach Wachstum über Nacht in BHI-Vollmedium. Die Zellen wurden in niedrigosmolalem Puffer gewaschen (116 mOsm/kg) und einem hyperosmotischen Schock mit 250, 400 oder 740 mM NaCl ausgesetzt, entsprechend 593, 897 und 1564 mOsm/kg (Quadrate, Kreise und Dreiecke) nach dem Schock. 30 s nach dem hyperosmotischen Schock wurden 2 mM Betain als Substrat sowie 25 µg/ml Chloramphenicol zugegeben.

Zellen, die über Nacht in BHI-Vollmedium gewachsen waren, zeigten eine stärkere und länger andauernde Kalium- und Volumenantwort auf hyperosmotischen Stress als Zellen, die über Nacht in MM1-Minimalmedium gewachsen waren. Abbildung 3.8a zeigt eine deutliche Kaliumaufnahme nach dem hyperosmotischen Schock. Die intrazelluläre Kaliummenge erhöhte sich innerhalb von einer Minute auf das 1,4- bis 1,7-fache. Interessanterweise war der Kaliumstrom beim hyperosmotischen Schock auf 1564 mOsm/kg am geringsten: Es wurde ein Anstieg von $388 \mu\text{mol (g BTM)}^{-1}$ auf $520 \mu\text{mol (g BTM)}^{-1}$ gemessen. Gleichzeitig führte

dieser stärkste applizierte hyperosmotische Schock jedoch zu einer starken Verringerung des Volumens von $1,62 \text{ ml (g BTM)}^{-1}$ auf $1,04 \text{ ml (g BTM)}^{-1}$, sodass sich die interne Kaliumkonzentration von 240 mM auf etwas mehr als 500 mM mehr als verdoppelte. Eine nahezu identische Veränderung der Kaliumkonzentration wurde nach dem hyperosmotischen Schock von 116 auf 897 mM beobachtet, nur dass in diesem Fall der Kaliumeinstrom von $388 \text{ } \mu\text{mol (g BTM)}^{-1}$ auf $650 \text{ } \mu\text{mol (g BTM)}^{-1}$ bedeutender und die Volumenverringerng von $1,62 \text{ ml (g BTM)}^{-1}$ auf $1,28 \text{ ml (g BTM)}^{-1}$ weniger bedeutend waren als beim erstgenannten Schock. In beiden Fällen änderten sich die nach einer Minute erreichten Volumina und Kaliumkonzentrationen im Laufe der folgenden 30 Minuten nur noch in geringem Ausmaß. Nach Applikation eines hyperosmotischen Schocks von 116 auf 593 mOsm/kg war innerhalb von einer Minute eine Erhöhung der Kaliumkonzentration auf das 1,5-fache zu beobachten, die im Wesentlichen durch einen Kaliumeinstrom von $405 \text{ } \mu\text{mol (g BTM)}^{-1}$ auf $580 \text{ } \mu\text{mol (g BTM)}^{-1}$ und nur wenig durch den Volumenverlust von $1,62 \text{ ml (g BTM)}^{-1}$ auf $1,52 \text{ ml (g BTM)}^{-1}$ bedingt war. Im Laufe der nächsten 30 Minuten kam es noch zu einem weiteren Volumenverlust auf bis zu $1,33 \text{ ml (g BTM)}^{-1}$ und zu geringen Erhöhungen der Kaliummenge. Die Kaliumkonzentration stieg folglich auf $650 \text{ } \mu\text{mol (g BTM)}^{-1}$.

3.4.2 Akkumulation internen Betains nach hyperosmotischem Schock

Eine Möglichkeit der Regulation der Aktivität von BetP während der Adaptation an hyperosmotischen Stress ist die einfache Produkthemmung nach Akkumulation internen Substrates. Dieser Regulationsmechanismus wurde für die Betaintransportsysteme aus *S. aureus* (Pourkomialian & Booth, 1994; Stimeling *et al.*, 1994) vorgeschlagen.

Zur Überprüfung simpler Produkthemmung wurden Zellen, die über Nacht in Minimal- oder Vollmedium gewachsen waren, hyperosmotischem Stress verschiedener Stärke ausgesetzt. Nach 30 Sekunden wurden wie in den bisherigen Experimenten $0,5 \text{ mM } [^{14}\text{C}]$ -markiertes Betain und Chloramphenicol zugegeben. Zu drei Zeitpunkten während der Adaptationsphase (30, 40 und 50 Minuten nach Applikation des Schocks) wurden Proben zur Bestimmung des internen Betaingehaltes genommen. Die gemittelte Betainmenge aus diesen drei Proben wurde als Betaingehalt im adaptierten Zustand gegen die Menge addierten Natriumchlorids aufgetragen.

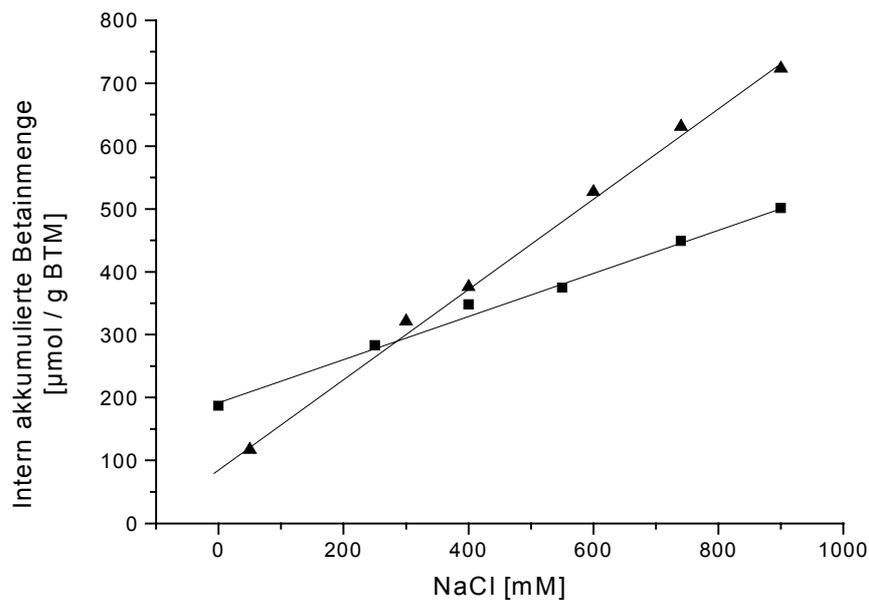


Abbildung 3.9: Interne Betainmenge nach Adaptation an hyperosmotische Bedingungen. DHPF pGTG (*betP*)-Zellen aus Übernachtskulturen in MM1-Minimalmedium (Quadrate) oder BHI-Vollmedium (Dreiecke) wurden nach hypoosmotischer Wäsche mit 25 mM KPi und 25 mM NaPi (MM1-Zellen) oder 50 mM KPi (BHI-Zellen) hyperosmotischen Bedingungen ausgesetzt. 30 Sekunden nach dem hyperosmotischen Schock wurden 0,5 mM Betain als Substrat sowie 25 µg/ml Chloramphenicol zugegeben. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Proben, die 30, 40 und 50 Minuten nach Betainzugabe genommen wurden.

Die interne Betainmenge war sowohl in Zellen aus Minimalmedium als auch in Zellen aus Vollmedium linear abhängig von der Stärke des applizierten hyperosmotischen Schocks. Daher kann die beobachtete Senkung der BetP-Aktivität nicht Folge einer einfachen Produktinhibition sein, die zu einem Stopp des Betainimportes bei einer bestimmten internen Konzentration führen müsste, unabhängig von der externen Osmolalität. Die Gleichgewichtskonzentration war weiterhin davon abhängig, in welchem Medium die Zellen gewachsen waren. In Zellen, die in Vollmedium gewachsen waren, war die akkumulierte Menge Betain deutlich stärker abhängig vom Ausmaß des hyperosmotischen Schocks als in Zellen, die in Minimalmedium gewachsen waren. Das führte dazu, dass in den Zellen, die in Vollmedium gewachsen waren, in der Adaptationsphase nach starken hyperosmotischen Schocks erheblich mehr Betain nachgewiesen werden konnte als in Zellen, die in Minimalmedium gewachsen waren, ohne Applikation eines hyperosmotischen Schocks dagegen weniger.

3.4.3 BetP-Aktivität nach Adaptation an hyperosmotischen Stress ohne Möglichkeit der Betainaufnahme

Eine einfache Produktinhibition konnte als Ursache für die Adaptationsregulation von BetP ausgeschlossen werden (vergleiche Abschnitt 3.4.2). Eine mehrfach postulierte Variation der Hemmung durch internes Substrat konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden: eine Hemmung, die durch osmotischen Stress aufgehoben wird. Diese Art der Regulation wurde für QacT aus *L. plantarum* (Glaasker *et al.*, 1998), einem Aufnahmesystem für Betain, Carnitin und Prolin, sowie für das Betainaufnahmesystem aus *L. monocytogenes* (Verheul *et al.*, 1997) vorgeschlagen. Für QacT wurde eine Inhibition durch hohe interne Konzentrationen des Substrates Prolin postuliert, die bei osmotischen Stress aufgehoben sein sollte. Betain und Carnitin wurden in dieser Studie nicht als potenzielle Inhibitoren getestet. Für das Aufnahmesystem von *L. monocytogenes* wurde diese Art der Regulation durch die Substrate Carnitin und Betain postuliert.

Zur Überprüfung dieses Modells für BetP darf keine Aufnahme von Betain in die Zelle zugelassen werden. Nur dann ist es möglich, zwischen der Regulation von BetP aufgrund osmotischer Kompensation per se oder einer Inhibition durch internes Substrat, die erst nach osmotischer Kompensation eintritt, zu unterscheiden. Daher wurde überprüft, ob die Adaptationsregulation von BetP auch ohne Anwesenheit internen Betains greift. In diesem Falle wäre nur die osmotische Kompensation eine mögliche Ursache für die Adaptationsregulation, nicht aber eine Inhibition durch internes Betain. In diesem Zusammenhang sei daran erinnert, dass *C. glutamicum* kein Betain synthetisieren kann.

Es wurde ein Experiment durchgeführt, in dem zwar eine Adaptation der Zellen an hyperosmotischen Stress stattfinden konnte, jedoch ohne die Möglichkeit des Imports von Betain. Die Zellen wurden daher nicht wie sonst üblich in Stickstoff-freiem Puffer hyperosmotisch geschockt, sondern in MM1-Medium. Dies ermöglichte die Synthese kompatibler Solute, da auf den Import kompatibler Solute verzichtet werden musste. Um den Zellen zu ermöglichen, Gene für Proteine zur Synthese anderer kompatibler Solute als Betain zu exprimieren, wurde auf die Zugabe von Chloramphenicol verzichtet. Im Falle von *C. glutamicum* sind die wichtigsten synthetisierten kompatiblen Solute Prolin und Trehalose (Wolf *et al.*, 2003). Mit Aliquoten aus der Zellsuspension wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die unidirektionale Betainaufnahme v_{up} durch BetP verfolgt. Als Maß der

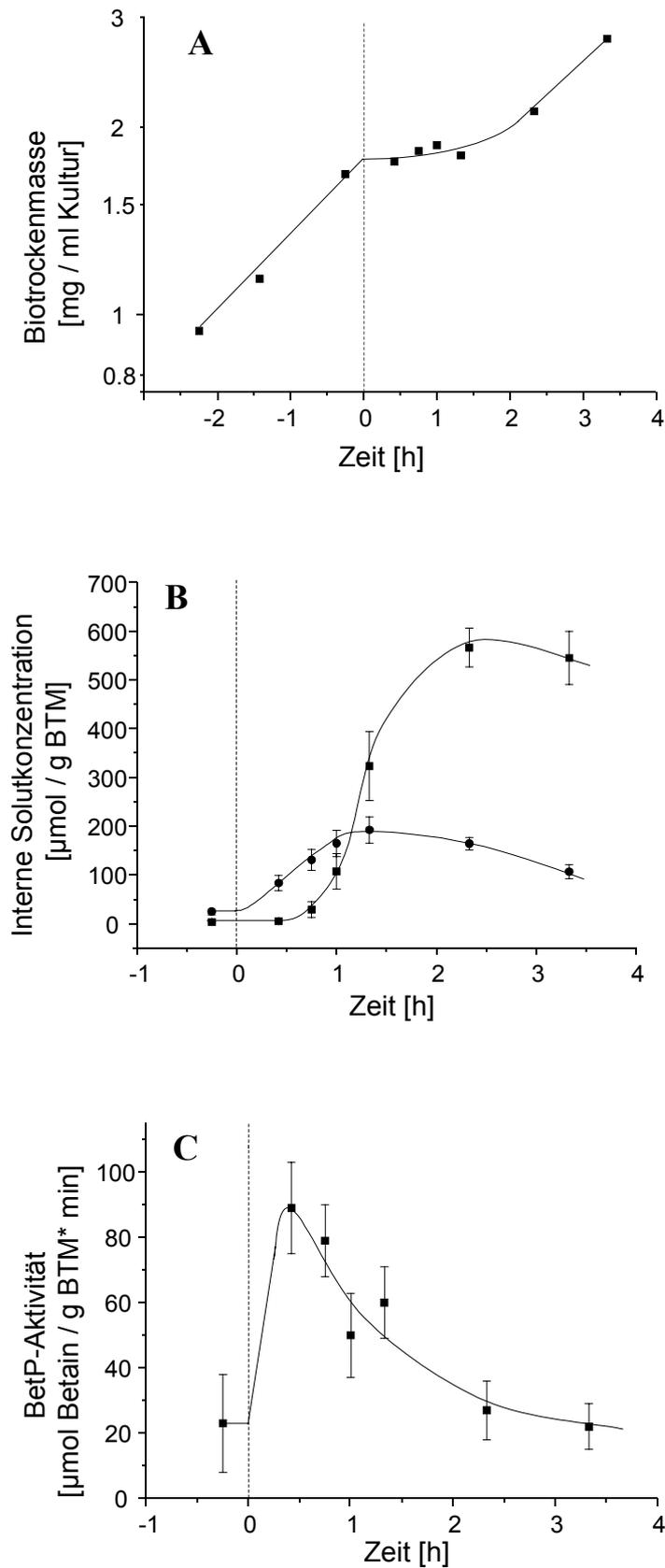


Abbildung 3.10: Adaptation von DHPF pGTG (*betP*)-Zellen an einen hyperosmotischen Schock in Abwesenheit von Betain. Die Zellen wurden über Nacht in MM1-Medium kultiviert und in MM1-Medium gewaschen. 2,5 h nachdem die Zellen gewaschen wurden, wurden 740 mM NaCl hinzugefügt ($t=0$). Um die Adaptation an hyperosmotischen Stress zu ermöglichen, wurde kein Chloramphenicol verwendet. A: Wachstumskurve, B: interne Mengen der kompatiblen Solute Trehalose (Kreise) und Prolin (Quadrate). C: Betainaufnahmegeschwindigkeit

osmotischen Kompensation wurden die internen Mengen der kompatiblen Solute Prolin und Trehalose gemessen und es wurde das Wachstum der Zellen verfolgt.

Nach Applikation des hyperosmotischen Stresses stellten die Zellen für einige Zeit das Wachstum ein, bevor sie nach anderthalb Stunden mit nahezu unveränderter Geschwindigkeit weiter wuchsen. Nach dem hyperosmotischen Schock wurde zunächst Trehalose synthetisiert, deren interne Menge nach 90 Minuten ein Maximum von circa $200 \mu\text{mol (g BTM)}^{-1}$ erreichte. Die interne Prolinmenge betrug zu diesem Zeitpunkt circa $300 \mu\text{mol (g BTM)}^{-1}$ und stieg im weiteren Verlauf des Versuches auf circa $600 \mu\text{mol (g BTM)}^{-1}$ an. Damit entsprach die Antwort auf osmotischen Stress in Betain-freiem Medium der bereits von Wolf *et al.* (2003) beschriebenen. BetP wurde wie in vorherigen Versuchen durch den osmotischen Schock aktiviert. Der maximale Wert der BetP-Aktivität wurde mit $90 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$ kurz nach dem hyperosmotischen Schock gemessen. Die Geschwindigkeit des Proteins sank sehr viel langsamer als in den Experimenten, in denen Betain als Substrat zur Verfügung stand und betrug 1,5 h nach dem hyperosmotischen Schock noch $60 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$. Sie nahm mit zunehmender Synthese der kompatiblen Solute Prolin und Trehalose ab. Nach Wiederaufnahme des Wachstums lag die BetP-Aktivität etwa auf dem Niveau vor dem hyperosmotischen Schock.

Da BetP somit auch ohne die Anwesenheit internen Betains in den adaptierten Zustand eintrat, der durch eine geringere Aktivität gekennzeichnet war, konnte ausgeschlossen werden, dass internes Betain als spezifischer Inhibitor bei osmotischer Kompensation von BetP wahrgenommen wird. Die vergleichsweise langsame Adaptationsantwort von BetP konnte damit zusammen hängen, dass in diesem Experiment die Zellen auf die Eigensynthese kompatibler Solute angewiesen waren und nicht wie in den anderen Experimenten Betain aufnehmen konnten.

3.4.4 Betainaufnahme der deregulierten Mutante BetP Δ 25

Die C-terminal um 25 Aminosäuren verkürzte Mutante BetP Δ 25 ist hinsichtlich der Aktivierung durch osmotischen Stress dereguliert (Peter *et al.*, 1998b). BetP Δ 25 war in Zellen auch dann aktiv, wenn kein hyperosmotischer Stress vorlag. In Proteoliposomen zeigte BetP Δ 25 im Gegensatz zu BetP auch ohne Erhöhung der luminalen Kaliumionenkonzentration Aktivität (Schiller *et al.*, 2004b).

In Aufnahmemessungen mit BetP Δ 25 wurde untersucht, inwieweit die Deregulierung dieser Mutante auch die Adaptationsregulation betraf und welche Auswirkungen die beeinträchtigte Regulation der Mutante auf die transmembranen Betainflüsse während der Anpassung von *C. glutamicum* an hyperosmotischen Stress hatte.

Zunächst wurde die Affinität von BetP Δ 25 in *C. glutamicum* DHPF für Natrium als $K_M = 134$ mM bestimmt. Damit war BetP Δ 25 erheblich weniger affin für Natriumionen als BetP, welches einen K_M von 4 mM aufweist (Farwick *et al.*, 1995). Die Affinitäten von BetP Δ 25 und BetP für Betain unterscheiden sich dagegen mit $K_M = 7,7$ μ M (Peter *et al.*, 1998b) in der Mutante gegenüber $K_M = 8,6$ μ M (Farwick *et al.*, 1995) im Wildtyp kaum.

Analog zu den Aufnahmemessungen mit BetP wurde auch die Aktivität von BetP Δ 25 nach verschieden starken hyperosmotischen Schocks sowie ohne Applikation eines Schocks untersucht (Abbildung 3.11).

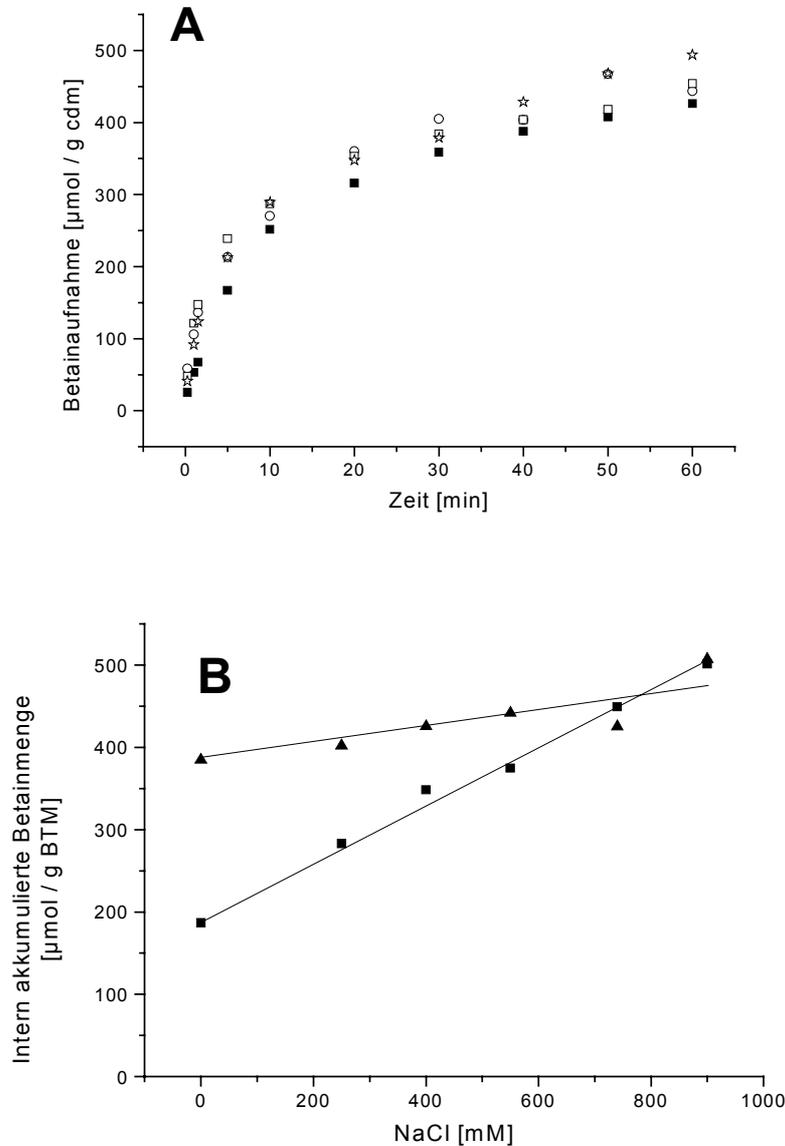


Abb. 3.11: A: Aufnahme von Betain durch BetP Δ 25 ohne und mit hyperosmotischem Schock nach Wachstum in MM1-Medium. Ausgehend von einer basalen Osmolarität von 116 mOsm/kg und einer Temperatur von 4°C, die durch das Waschen der Zellen mit 25 mM KPi 25 mM NaPi pH 7,5 eingestellt wurden, wurden DHPF pC2 (*betP Δ 25*)- Zellen in 30°C warmen Puffer der gleichen Osmolarität (geschlossene Quadrate) oder mit den Osmolaritäten 593, 897 oder 1564 mOsm/kg (offene Quadrate, Kreise und Sterne) überführt. Nach 30 s wurden 0,5 mM [14 C]-Betain als Substrat sowie 25 µg/ml Chloramphenicol zugegeben. B: Interne Betainmenge nach Adaptation an hyperosmotische Bedingungen. DHPF pC2 (*betP Δ 25*)- Zellen (Dreiecke) oder DHPF pGTG (*betP*)-Zellen (Quadrate; Daten aus Abbildung 3.9) aus Übernachtskulturen in MM1-Minimalmedium wurden nach hypoosmotischer Wäsche mit 25 mM KPi und 25 mM NaPi hyperosmotischen Bedingungen ausgesetzt, indem die angegebene Menge NaCl zugegeben wurde. 30 Sekunden nach dem hyperosmotischen Schock wurden Betain als Substrat sowie 25 µg/ml Chloramphenicol zugegeben. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Proben, die 30, 40 und 50 Minuten nach Betainzugabe genommen wurden.

Tabelle 3.4: Transmembran-Betainflüsse in verschiedenen Phasen osmotischer Aktivierung von *C. glutamicum* DHPF pC2 (*betPΔ25*).

Medium	Situation im Experiment (Zeitraum der Messung)		Osmolalität [mOsm/kg]	V_{net}	V_{up}	V_{ef}	V_{ef}/V_{up}
				[$\mu\text{mol min}^{-1} \text{g BTM}^{-1}$]			
MM I	I	ungeschockt, Anfangsphase (0 – 1 min)	116 (konstant)	= V_{up}	63.3 ± 7.6	0.0**	0.0**
	II	erster osmotischer Schock (0–45sec)	116 → 593	= V_{up}	95.4 ± 8.0	0.0**	0.0**
		erster osmotischer Schock (0–45sec)	116 → 897	= V_{up}	90.9 ± 7.3	0.0**	0.0**
		erster osmotischer Schock (0–45sec)	116 → 1564	= V_{up}	95.4 ± 11.2	0.0**	0.0**
	III	ungeschockt; Adaptationsphase (40–60min)	116 (konstant)	1.2 ± 0.3	6.6 ± 1.8	5.5 ± 2.0	0.80±0.05
		Adaptationsphase (40 – 60 min)	593 (konstant)	0.68±0.17	9.2 ± 2.9	8.5 ± 2.7	0.92±0.02
BHI	I	ungeschockt (0 – 10min)	209 (konstant)	n.d.	28.3 ± 7.4	n.d.	n.d.
	II	erster osmotischer Schock (0–45sec)	116 → 593	n.d.	95.1 ± 9.5	n.d.	n.d.
		erster osmotischer Schock (0–45sec)	116 → 897	n.d.	91.3 ± 17.6	n.d.	n.d.
	III	ungeschockt; Adaptationsphase (40–60min)	209 (konstant)	9.5 ± 0.2	20.2 ± 1.8	10.7±2.09	0.53±0.15
		Adaptationsphase (40 – 60 min)	897 (konstant)	7.3 ± 0.8	24.3 ± 3.2	17.0 ± 4.0	0.70±0.26

Daten teilweise aus Abbildung 3.11a. Die angegebenen Werte für die Geschwindigkeit repräsentieren die Steigung einer Gerade durch die ersten drei Messwerte nach dem jeweiligen hyperosmotischen Schock, entsprechend 15, 30 und 45 Sekunden nach Zugabe des Osmolyten.

** Zellen aus Minimalmedium können zu Versuchsbeginn kein Betain enthalten, daher ist kein Efflux zu Versuchsbeginn möglich

n.d. = nicht definiert, da zu Versuchsbeginn Efflux vorhandenen, unmarkierten Betains möglich, aber nicht messbar

Die basale Betain-Aufnahmegeschwindigkeit ohne hyperosmotischen Schock betrug $63,3 \pm 7,6 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$ bei 116 mOsm/kg und nach Wachstum in Minimalmedium (Tabelle 3.4, Abbildung 3.11a). Die Addition von Natriumchlorid als Osmolyt bewirkte eine schnellere Aufnahmeaktivität, die der erhöhten Konzentration des Kosubstrates Na^+ zuzurechnen ist und in *C. glutamicum* DHP1 pC2 (*C. glutamicum* Wildtyp ATCC13032 ΔbetP mit *betPΔ25*-Gen auf Plasmid) bereits gezeigt wurde (Peter *et al.*, 1998b). Die gemessenen Geschwindigkeiten lagen nach Zugabe von 250, 400 oder 740 mM NaCl bei $95,4 \pm 8,0 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$, $90,9 \pm 7,3 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$ und $95,4 \pm 11,2 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$ (siehe Tabelle 3.4). In allen Fällen sank die Nettoimportgeschwindigkeit von Betain durch BetPΔ25 im Zeitraum der Antwort auf den applizierten osmotischen Stress, ebenso wie es für BetP beobachtet worden war (siehe Abbildung 3.4). Folglich kann auch hier von einer Adaptationsphase gesprochen werden. Die unidirektionale Aufnahmegeschwindigkeit sank in dieser Adaptationsphase signifikant (vergleiche Tabelle 3.3), sowohl bei ungeschockten als auch bei geschockten Zellen, und es konnte Gegentauschaktivität beobachtet werden. Die Gegentauschaktivität machte in BetPΔ25 wie in BetP den Großteil

der Gesamtaktivität aus, was am Parameter v_{ef}/v_{up} abgelesen werden kann. Damit war dieser Teil der Adaptationsregulation in BetP Δ 25 im Gegensatz zur Aktivierungsregulation intakt. Die Gesamtmenge internen Betains in der adaptierten Phase war hingegen nur wenig von der Stärke des applizierten hyperosmotischen Stresses abhängig (Abbildung 3.11b). BetP Δ 25 war also in der Lage, trotz Deregulierung hinsichtlich des aktivierenden Stimulus in die Adaptationsphase einzutreten. Dabei war die Quantität der Osmostressantwort jedoch gestört.

3.4.5 Regulation heterolog exprimierten BetP-Proteins in *E. coli* MKH13

Neben den bisher als mögliche Stimuli für die Adaptationsregulation von BetP untersuchten Kandidaten könnten auch eine chemische Modifikation oder die Interaktion mit einem regulatorischen Protein für die Änderung des Aktivitätsstatus von BetP verantwortlich sein. In diesem Fall müsste eine heterologe Expression in *E. coli* zu einem signifikant anderen Regulationsmuster führen, da spezifische Wechselwirkungen wie eine Modifikation von BetP oder die Assoziation von BetP und einem weiteren Protein in einem anderen Organismus sehr unwahrscheinlich sind. *E. coli* eignet sich in diesem Zusammenhang sehr gut für die heterologe Expression, da es als Gram-negatives Bakterium nicht verwandt mit *C. glutamicum* ist. Die beiden BetP am nächsten verwandten Proteine in *E. coli*, das Cholinaufnahmesystem BetT (Lamark *et al.*, 1994) und das nicht osmoregulierte Carnitinaufnahmesystem CaiT (Eichler *et al.*, 1995) weisen 36 % und 28 % Identität zu BetP auf (Peter *et al.*, 1996).

Es wurde das *streptbetP* tragende Plasmid pAcl1 (Rübenhagen *et al.*, 2001) in *E. coli* MKH13 (Haardt *et al.*, 1995) transformiert und die Aktivität des Genproduktes nach hyperosmotischem Schock und unter Adaptationsbedingungen getestet. *E. coli* MKH13 besitzt wie *C. glutamicum* DHPF keine Aufnahmesysteme für kompatible Solute und kann kein Betain synthetisieren. Die Expression von *streptbetP* in *E. coli* MKH13 lieferte ein funktionsfähiges und osmoreguliertes Protein (Schiller *et al.*, 2004b). Da *E. coli* weniger tolerant gegenüber hyperosmotischen Bedingungen ist als *C. glutamicum*, wurden die Zellen in 100 mM Tris/MES-Puffer gewaschen und lediglich mit 200 mM Natriumchlorid osmotisch geschockt. Daraus ergab sich eine Änderung der Osmolalität von 100 mOsm/kg auf 486 mOsm/kg.

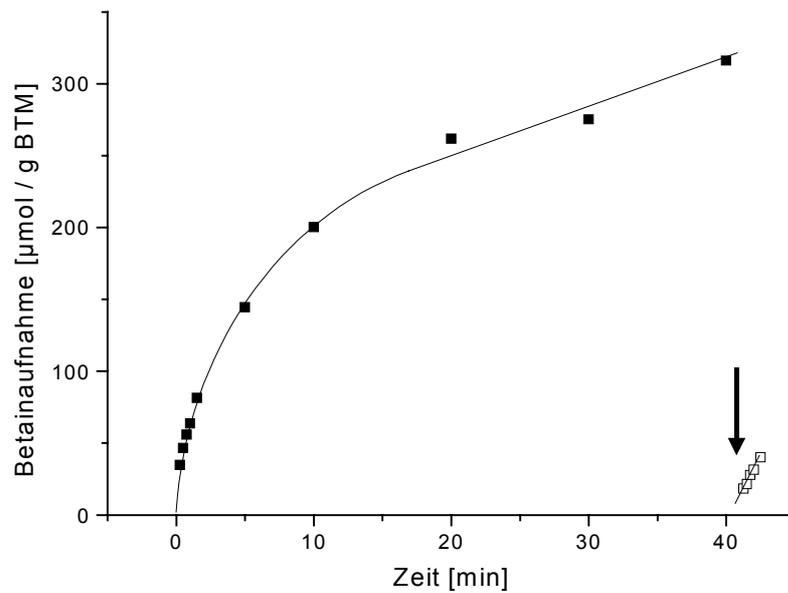


Abbildung 3.12: Betainaufnahme durch *E. coli* MKH13, die ein *strepbetP* kodierendes Plasmid trugen. Die Zellen wuchsen über Nacht in Minimalmedium (Davis und Mingioli, 1950) und wurden bei 4°C mit 100 mM Tris/MES pH 7,5, 10 mM Glukose gewaschen. Zur Aktivierung von BetP wurden die Zellen auf 30°C erwärmt und mit 200 mM NaCl versetzt. 30 Sekunden später wurden 0,5 mM [^{14}C]-Betain als Substrat sowie 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Chloramphenicol zugegeben (ausgefüllte Quadrate). Nach 41 Minuten wurde trägerfreies [^3H]-Betain zugegeben und dessen Aufnahme über 1,5 Minuten verfolgt, um die aktuelle unidirektionale Importgeschwindigkeit von BetP bestimmen zu können (offene Quadrate; in der Abbildung durch einen Pfeil gekennzeichnet).

BetP wurde auch im heterologen System unmittelbar nach dem hyperosmotischen Schock aktiviert (Abbildung 3.11). Es wurde eine Betain-Importgeschwindigkeit von $42 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$ gemessen, die während der Adaptationsphase (20-40 min) auf $3 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$ sank. Der unidirektionale Import sank auf $19 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$ und damit ebenfalls auf einen signifikant niedrigeren Wert. Damit war ein Absinken der BetP-Aktivität im heterologen System wie in *C. glutamicum* zu beobachten, wenn auch in geringerem Ausmaß. Die Gegentauschaktivität im adaptierten Zustand war nach heterologer Expression ebenfalls zu beobachten und machte einen Anteil von 0,84 an der Gesamtaktivität von BetP aus. Das in beiden Bakterien ähnliche Verhalten von BetP aus *C. glutamicum* schließt eine Regulation der Aktivität durch spezifische Wechselwirkungen mit anderen Proteinen mit großer Wahrscheinlichkeit aus.

4 Diskussion

Zur optimalen Adaptation an hyperosmotischen Stress gehört neben der schnellen Antwort auf die veränderte Situation die Einstellung der Konzentration kompatibler Solute in Abhängigkeit vom Ausmaß der Stress-Situation. Während BetP und andere Transporter kompatibler Solute hinsichtlich der Aktivierungsregulation nach hyperosmotischem Stress bereits ausführlich charakterisiert wurden, behandelte diese Arbeit mit der Adaptationsregulation des Proteins einen bisher kaum beachteten Aspekt der Osmoregulation. Dabei wurde die Aktivität von BetP während der Adaptation an hyperosmotischen Stress untersucht und die Beteiligung weiterer Exportproteine an der Adaptation beurteilt. Schwerpunkt dieser Arbeit war die Suche nach möglichen Stimuli, die während der Adaptation der Zellen an hyperosmotischen Stress auf BetP wirken und die Aktivität des Transporters modulieren. Die im Verlauf der Arbeit beobachteten Unterschiede von in Voll- und Minimalmedium gewachsenen Zellen in der Reaktion auf osmotischen Stress werden ebenfalls diskutiert. Das verwendete System *C. glutamicum* DHPF pGTG (*betP*) eignete sich besonders zur Charakterisierung von BetP, da im vorliegenden Stamm alle bekannten Gene für Importproteine kompatibler Solute deletiert waren. BetP war folglich nach kontrollierter Expression des Plasmid-kodierten *betP*-Genes das einzige vorhandene bekannte Importsystem für kompatible Solute.

4.1 BetP-Aktivität und Natriumpotenzial

Zur Untersuchung der Regulation eines Natriumionen-getriebenen sekundären Transporters gehört die Beurteilung des Einflusses des elektrochemischen Natriumionenpotenzials über die Membran auf die Aktivität des Transporters. Änderungen im Potenzial können Aktivitätsänderungen des Transporters hervorrufen und somit eine Regulation vortäuschen. Dies gilt zum einen für die Aktivierung des Transporters nach Addition des Osmolyten NaCl bei der Einstellung hyperosmotischer Bedingungen. Zum anderen kann eine erwartete Senkung der Importgeschwindigkeit während der Adaptation an hyperosmotischen Stress theoretisch auch darauf zurückgeführt werden, dass die Zellen nicht in der Lage waren, das Natriumpotenzial aufrechtzuerhalten.

Die erste Hypothese, die in einer Änderung des Natriumionenpotenzials durch Zugabe des Osmolyten NaCl einen substantiellen Beitrag zur BetP-Aktivierung vorsah, wurde widerlegt,

indem KCl statt NaCl als Osmolyt verwendet wurde. Ein hyperosmotischer Schock mit Kaliumchlorid, der keine direkten Veränderungen des elektrochemischen Natriumpotenzials zur Folge haben konnte, bewirkte eine nahezu identische Antwort durch BetP wie ein hyperosmotischer Schock mit NaCl. Die Wahl von KCl oder Prolin statt NaCl als Osmolyten für einen zweiten hyperosmotischen Schock führte zu vergleichbar hohen Betain-Aufnahmegeschwindigkeiten. Daher war auch in dieser Phase das Natriumpotenzial kein entscheidender Faktor der Aktivierung von BetP. Die Hypothese, die BetP-Aktivierung sei potenzialbedingt, konnte damit verworfen werden.

Auch die Abnahme der BetP-Aktivität wegen Verringerung des Natriumpotenzials ist bei den vorliegenden Versuchsbedingungen unwahrscheinlich. BetP ist in der Lage, Betain bis zu einem Faktor von 10^6 zu akkumulieren (Farwick *et al.*, 1995). Bei den hier durchgeführten Aufnahmeexperimenten wurde jedoch bereits bei einer 400-fachen Anreicherung von Betain in den Zellen eine Verringerung der BetP-Aktivität beobachtet (Abschnitt 3.1). Die 400-fache Anreicherung errechnet sich aus der internen Betainmenge von $300 \mu\text{mol (g BTM)}^{-1}$ (Abbildung 3.1) und einem Zellvolumen von $1,5 \text{ ml (g BTM)}^{-1}$ (Abbildung 3.6), was eine interne Betainkonzentration von 200 mM ergibt gegenüber den extern zugegebenen 0,5 mM.

Ein weiteres Argument gegen den Zusammenbruch des Natriumpotenzials als Ursache für die Verringerung der Betainimport-Geschwindigkeit binnen kurzer Zeit nach der Aktivierung liefert wiederum die Beobachtung aus Abbildung 3.2 und Tabelle 3.1, dass eine erneute Aktivierung von BetP nach der Adaptation auch mit Kaliumchlorid oder Prolin möglich war und die Wahl des Osmolyten keinen signifikanten Einfluss auf die Nettoimportgeschwindigkeit nach dem zweiten hyperosmotischen Schock hatte. Das Natriumpotenzial konnte daher nicht zusammengebrochen sein.

Durch Messung des Glutaminimports zu mehreren Zeitpunkten vor und nach einem hyperosmotischen Schock konnte gezeigt werden, dass sich das elektrochemische Natriumionenpotenzial über die Membran vor dem hyperosmotischen Schock und in der Adaptationsphase nicht unterscheidet. Die Aktivität des Glutaminimporters aus *C. glutamicum* wurde stellvertretend für das elektrochemische Natriumionenpotenzial gemessen, da sie ausschließlich von diesem abhängig ist (Siewe *et al.*, 1995). Veränderungen der Aktivität des Transporters können daher Veränderungen im Natriumpotenzial anzeigen. Bis auf einen Einbruch der Transportaktivität des Glutaminimporters im Moment des hyperosmotischen Schocks arbeitete das Protein mit konstanter Geschwindigkeit. Die Höhe des elektrochemischen Natriumionenpotenzials während der Adaptationsphase entsprach damit wahrscheinlich der vor dem hyperosmotischen Schock. Änderungen des Natrium-

ionenpotenzials sind daher als Ursache für die Verlangsamung der BetP-Aktivität nicht zu vermuten.

Für den beobachteten transienten Einbruch der Glutaminimport-Geschwindigkeit direkt nach dem hyperosmotischen Schock gibt es zwei mögliche Erklärungen. Wegen des schnellen Betainimports durch BetP, der auch den Symport von zwei Natriumionen pro Betainmolekül bedeutet, konnte der Wert des Natriumpotenzials vorübergehend verringert worden sein, wodurch auch die Geschwindigkeit des Natriumionen-getriebenen Glutaminimporters beeinflusst würde. Unabhängig davon kann auch eine Verformung der Zellmembran Ursache einer vorübergehenden Abnahme der Glutaminimportgeschwindigkeit sein: In *E. coli* wurde beobachtet, dass direkt nach einem hyperosmotischen Schock einige Transporter, darunter auch sekundäre, vorübergehend ihre Aktivität nahezu völlig einstellten (Roth *et al.*, 1985a). Dieser Effekt wurde damit begründet, dass sich wegen der auf den hyperosmotischen Schock folgenden Plasmolyse der Bakterien die Zellmembran verformte und dadurch die Membrankomponenten der Transportsysteme in eine weniger aktive Konformation gezwängt wurden (Roth *et al.*, 1985b; Houssin *et al.*, 1991).

4.2 Betainflüsse, beteiligte Proteine und deren Regulation nach einem hyperosmotischem Schock

C. glutamicum DHPF pGTG (*betP*)-Zellen akkumulierten nach einem hyperosmotischen Schock Betain. Einer kurzen Phase schnellen Betainimports direkt nach dem hyperosmotischen Schock folgte die sogenannte Adaptationsphase, in der nur noch sehr geringer Betainimport stattfand. Die Menge des in der Adaptationsphase akkumulierten Betains war von der Stärke des hyperosmotischen Schocks abhängig. Der in der Adaptationsphase erreichte Zustand mit nur noch geringem Betain-Nettoimport muss mechanistisch nicht notwendig durch einen nahezu völligen Stillstand von BetP, dem in diesem System einzigen Betainimporter, charakterisiert sein. Vielmehr besteht die Möglichkeit, dass BetP weiterhin aktiv ist, aber parallel zum Import durch BetP Export durch Kanäle, spezifische Carrier oder BetP-vermittelten Gegentausch stattfindet. Mechanosensitive Kanäle würden allerdings erst bei stark erhöhtem Turgordruck öffnen und dann mit mäßiger Spezifität Solute entlassen. Ein Carrier könnte einen regulierten Export von Soluten wie Betain mit höherer Spezifität katalysieren. Der einzig mögliche energieneutrale Export von Betain ist jedoch der durch den Gegentausch, der ein inhärenter Bestandteil der Aktivität sekundärer Transporter ist. Die

Existenz von mechanosensitiven Kanälen in *Corynebacterium glutamicum* konnte schon früher nachgewiesen werden (Ruffert *et al.*, 1997; Nottebrock *et al.*, 2003), im Gegensatz zu einem Exportcarrier für Betain.

Regulationsmechanismen von Transportern in der Adaptationsphase nach hyperosmotischen Stress wurden bereits für einige Organismen beschrieben. Die vorliegende Arbeit profitiert allerdings als einzige davon, dass mit *C. glutamicum* DHPF pGTG (*betP*) in einem System gearbeitet wurde, das nur den untersuchten Transporter als Importer für kompatible Solute enthielt. Mithilfe der Doppelmarkierungsexperimente konnten außerdem die Betainflüsse nach Nettoimport v_{net} , unidirektionalem Influx v_{up} und Efflux v_{ef} aufgeteilt werden. Zusätzlich wurde der Parameter $v_{\text{ef}}/v_{\text{up}}$ als Anteil des Effluxes am unidirektionalen Influx und somit an der Gesamtaktivität von BetP definiert.

Die Aufschlüsselung der Betainflüsse ermöglichte den Nachweis, dass die signifikante Abnahme der Nettogeschwindigkeit des Betainimports während der Adaptationsphase zwei Ursachen hatte: Neben einer Verlangsamung der Gesamt-Importaktivität fand auch Betainexport statt, dessen Geschwindigkeit circa zwei Drittel der Importgeschwindigkeit betrug. Einen wichtigen Hinweis darauf, ob dieser Betainexport durch mechanosensitive Kanäle, Exportcarrier oder Gegentausch von BetP vermittelt wurde, lieferte die Analyse der Betainflüsse nach einem zweiten hyperosmotischen Schock. Die Öffnung eines mechanosensitiven Kanals ist in dieser Situation ausgeschlossen, da diese Proteine nur bei erhöhtem Turgordruck öffnen (Sukharev *et al.*, 2001), der hyperosmotische Schock aber den Turgordruck erniedrigt. Ein Exportcarrier würde, sofern er osmotisch reguliert ist, nach einem hyperosmotischen Schock ebenfalls seine Arbeit einstellen. Falls die Aktivität eines solchen Proteins ausschließlich durch die interne Betainkonzentration oder den transmembranen Betaingradienten bestimmt würde, so müsste im Moment des hyperosmotischen Schocks die Geschwindigkeit des Exports konstant bleiben und dann proportional mit der internen Betainkonzentration ansteigen. Beobachtet wurde dagegen eine bis zu zehnfache Steigerung des Betainexports. Interessanterweise stieg die Betainexportgeschwindigkeit nach dem zweiten hyperosmotischen Schock proportional zur Geschwindigkeit des Betainimports an, sodass der Effluxanteil $v_{\text{ef}}/v_{\text{up}}$ konstant blieb. Diese Beobachtungen lassen sich nicht mit der Beteiligung von Effluxproteinen an den Betainflüssen vereinbaren. Im Gegensatz dazu kann eine Geschwindigkeitsänderung des Transporters bei konstantem Gegentauschanteil von etwa zwei Dritteln der gesamten Aktivität von BetP den beobachteten Übergang von der Adaptationsphase zur Antwort auf den zweiten hyperosmotischen Schock vollständig erklären. Dieser Anteil ist angesichts hoher interner Betainkonzentration zu diesem Zeitpunkt

realistisch. Mechanistisch bedeutet dies, dass nach Abgabe des Substrates ins Cytoplasma (Reaktion 4 in Abbildung 1.2) die Rückreaktion über die Aufnahme cytoplasmatischen Substrates, Konformationsumwandlung des beladenen Transporters und Abgabe des Substrats ins externe Kompartiment (Reaktionen 4, 3, und 2) schneller verläuft als die Abgabe des Kosubstrates ins Cytoplasma und die anschließende Konformationsumwandlung des unbeladenen Transporters (Reaktionen 5 und 6), die im Allgemeinen den Energie übertragenden Schritt im Reaktionszyklus beinhalten. Ein weiteres Argument für die These, dass kein separates Exportprotein an der Regulation der internen Betainmenge nach einem hyperosmotischen Schock beteiligt ist, liefert der Vergleich der akkumulierten Betainmenge von Zellen, die *betP* und *betP Δ 25* exprimierten. Die Mutante *BetP Δ 25* ist hinsichtlich der Aktivierung dereguliert und importiert im Gegensatz zu *BetP* auch bei isoosmotischen externen Bedingungen mit signifikanter Geschwindigkeit Betain. Obwohl Zellen, die *betP* oder *betP Δ 25* exprimieren, die gleichen Exportsysteme besitzen müssen, unterscheidet sich die nach hyperosmotischem Schock akkumulierte Betainmenge signifikant. Ein in die Regulation involviertes Effluxsystem für Betain dürfte aber in den beiden Stämmen kein unterschiedliches Verhalten zeigen.

BetP konnte somit in dieser Arbeit neben den bekannten Eigenschaften als Osmosensor (Rübenhagen *et al.*, 2001) und Osmoregulator (Peter *et al.*, 1996) eine weitere Funktion zugeschrieben werden: Es kann ohne Anwesenheit von anderen Exportern eine optimale Anpassung an hyperosmotischen Stress gewährleisten, indem es nach dessen Kompensation den Nettoimport seines Substrates weitestgehend einstellt. Auch die Beteiligung eines zusätzlichen regulatorischen Proteins, das die *BetP*-Aktivität modifizieren könnte, ist unwahrscheinlich, da die Adaptationsregulation von *BetP* auch im heterologen System funktionierte (siehe Abschnitt 4.4.3). Damit ist *BetP* das erste Protein, für das gezeigt werden konnte, dass es neben der Wahrnehmung hyperosmotischen Stresses nicht nur die neue Situation durch Import seines Substrates beantwortet, sondern darüber hinaus auch das Ausmaß der Antwort eigenständig regulieren kann. *C. glutamicum* ist weiterhin der erste Organismus, für den eine Adaptation an hyperosmotischen Stress ohne Beteiligung eines Exportproteins beschrieben wurde.

Die Regulation von *OpuA* aus *L. lactis* durch die Ionenstärke, die über Protein-Membran-Wechselwirkungen die Aktivität des Proteins beeinflusst (van der Heide & Poolman, 2000b), lässt jedoch eine Kombination der *BetP* zugeordneten Eigenschaften auch in diesem Protein möglich erscheinen. Dies gilt bedingt auch für den sekundären Betain- und den primären Carnitin-Importer aus *L. monocytogenes*, für die eine Hemmung durch die intern

akkumulierten Substrate jeweils beider Transporter postuliert wurde (Verheul *et al.*, 1997). In diesen Organismen wurden aber bisher keine detaillierten Studien zum Influx und Efflux kompatibler Solute während der Adaptation an hyperosmotischen Stress durchgeführt.

Die Regulation der Betainimporter aus *S. typhimurium* macht dagegen die Anwesenheit von Exportsystemen zwingend erforderlich: die Transporter, ein primärer und ein sekundärer, verlangsamten ihre Importgeschwindigkeit nach Adaptation an den hyperosmotischen Stress nicht (Koo *et al.*, 1991). Da ein primärer Transporter höchstwahrscheinlich keinen Gegentausch betreiben kann, muss das durch ihn importierte Betain durch ein anderes Protein die Zelle wieder verlassen, wenn kein Nettoimport beobachtet wird. In *S. typhimurium* wurde auch ein experimenteller Hinweis auf ein Exportsystem gefunden. In *L. plantarum* wurde nach ausführlichen Experimenten, die auch Doppelmarkierungsexperimente einschlossen, die Existenz eines Effluxsystems postuliert, welches im Gleichgewichtszustand die fortgesetzte Aktivität des Importers kompensieren sollte (Glaasker *et al.*, 1996b). Die Mechanismen der Adaptation an hyperosmotischen Stress haben sich also in verschiedenen Organismen unterschiedlich entwickelt. Die energetisch günstigste Variante ist allerdings die in *C. glutamicum* DHPF pGTG (*betP*) gefundene, da sie keine nutzlosen Import- und Exportzyklen von Substraten beinhaltet, sondern lediglich den energieneutralen Gegentausch.

4.3 Einfluss unterschiedlicher Wachstumsbedingungen auf die Adaptation von *C. glutamicum* an hyperosmotischen Stress

In verschiedenen Experimenten dieser Arbeit zeigten die Zellen je nach Wachstumsmedium ein unterschiedliches Verhalten. Die festgestellten Differenzen hinsichtlich der BetP-Aktivität, der akkumulierten Menge Betain nach einem hyperosmotischen Schock, vor allem aber in der Kalium- und Volumenantwort der Zellen werden in diesem Abschnitt diskutiert.

Die prinzipielle Regulation von BetP wird nicht durch die Wachstumsgeschichte beeinflusst, wie die Aufnahmemessungen aus Tabelle 3.2 zeigten. Wenn nach der hypoosmotischen Waschprozedur kein hyperosmotischer Schock folgte, wiesen Zellen aus einer MM1-Kultur jedoch eine höhere initiale BetP-Aktivität und eine höhere Betain-Gesamtaufnahme nach 30 bis 50 Minuten auf als Zellen aus BHI-Kultur. Nach starken hyperosmotischen Schocks nahmen dagegen in BHI-Kultur gewachsene Zellen deutlich schneller Betain auf als in MM1-Medium gewachsene Zellen, und in der folgenden Adaptationsphase war die Betainmenge in den in BHI-Kultur gewachsenen Zellen deutlich höher.

Die Unterschiede in der Anfangsaktivität in ungeschockten Zellen und in der Gesamtmenge von BetP akkumulierten Betains nach 30-50 Minuten in diesen Zellen können wie folgt erklärt werden: In Minimalmedium gewachsene Zellen konnten während ihrer Kultivierung kein Betain importieren. Daher war die Anfangsaktivität bei den in Minimalmedium gewachsenen Zellen eine echte initiale Aktivität. Dagegen konnten in Vollmedium gewachsene Zellen bereits während der Übernachtkultur Betain importieren und enthielten bei Versuchsbeginn auch nach der hypoosmotischen Wäsche noch circa $130 \mu\text{mol} / \text{mg BTM}$, entsprechend circa 80 mM , an Betain (Tabelle 3.1). Die gemessene Aktivität war folglich keine initiale Aktivität. Die auch nach 30 bis 50 Minuten geringere importierte Menge Betain in ungeschockten Zellen aus BHI-Übernachtkultur ist darauf zurückzuführen, dass die internen und externen Mengen Betain in diesem Falle nicht vollständig äquilibriert waren: Die durchschnittliche Aufnahmegeschwindigkeit von circa $1,5 \text{ nmol min}^{-1} (\text{g BTM})^{-1}$ würde innerhalb einer Stunde selbst bei 100%-iger Gegenausaktivität nicht zu einer Äquilibration der spezifischen Radioaktivität der internen und externen Betainmengen führen. Das auf-genommene radioaktiv markierte Betain repräsentierte in Zellen aus einer BHI-Übernachtkultur also nur einen Teil des intrazellulären Betains; die Gesamtmenge internen Betains kann daher trotzdem identisch sein.

Die beobachtete schnellere Importaktivität in Vollmedium gewachsener Zellen nach einem hyperosmotischen Schock von 116 mOsm/kg auf 897 mOsm/kg kann darauf hinweisen, dass hyperosmotischer Stress eine stärkere Auswirkung auf in BHI-Medium gewachsene Zellen hat und BetP in Folge stärker aktiviert wurde. Dieser Aspekt wird durch die Unterschiede in der Menge des nach einem hyperosmotischen Schock akkumulierten Betains und in der Kalium- und Volumenantwort der Zellen aus verschiedenen Kultivierungen weiter verdeutlicht.

Die Veränderungen in Volumen und Kaliumkonzentration in den aus BHI-Kultur stammenden Zellen waren sowohl stärker als auch länger andauernd als bei den Zellen, die über Nacht in Minimalmedium gewachsen waren. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass bestimmte Mechanismen der Adaptation an hyperosmotischen Stress besser oder schneller funktionieren, wenn Zellen in Minimalmedium wachsen. In diesem Zusammenhang kann auch das Ergebnis interpretiert werden, dass Zellen aus Anzucht in Vollmedium mehr Betain akkumulierten als Zellen aus Anzucht in Minimalmedium. Die geringere aufgenommene Betainmenge der in Minimalmedium gewachsenen Zellen kann auf eine stärkere Eigensynthese kompatibler Solute der Zellen zurückgeführt werden, falls sie wegen der Nährstoffknappheit im Medium einen aktiveren Stoffwechsel hatten. Wenn bereits vor dem hyper-

osmotischen Schock signifikante Differenzen im Proteom und Metabolom der Zellen aus verschiedenen Anzuchten vorliegen, kann man außerdem postulieren, dass der hyperosmotische Schock eine verschieden starke Auswirkung auf die unterschiedlich gewachsenen Zellen hatte. Unterschiede in der Genexpression von Zellen aus Kultur in Voll- oder Minimalmedium wurden unter anderem in *E. coli* untersucht (Tao *et al.*, 1999). Bakterien, die in Minimalmedium wuchsen, exprimierten viele Gene stärker als Bakterien, die in Vollmedium wuchsen, darunter auch viele Synthesegene für Aminosäuren, Energiestoffwechsel und Transport. Auch in *Pasteurella multocida* und *Caulobacter crescentus* wurden große Differenzen hinsichtlich der Genexpression festgestellt, wenn das Transkriptom von Zellen, die in Minimal- und Vollmedium wuchsen, verglichen wurde (Paustian *et al.*, 2002; Hottes *et al.*, 2004). Da bis zu einem Drittel der untersuchten Gene je nach Medium unterschiedlich stark exprimiert wurden, scheint das Medium einen entscheidenden Einfluss auf die Proteinausstattung der Zellen zu haben. Daher ist es durchaus möglich, dass eine je nach Wachstumsmedium unterschiedliche Zusammensetzung des Cytoplasmas Zellen besser oder schlechter auf einen hyperosmotischen Schock vorbereitet. Proteine, die an der unmittelbaren Antwort auf osmotischen Stress beteiligt sind, könnten in Zellen, die in Minimalmedium wuchsen, bereits stärker exprimiert sein. Das *betP*-Gen sollte dagegen unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors unabhängig von den Wachstumsbedingungen exprimiert werden. Der Anteil von BetP an der Antwort auf hyperosmotischen Stress wäre daher dann geringer, wenn nach Wachstum in Minimalmedium bereits einige allgemein Stress-relevante Gene exprimiert würden, die dann auch die Anpassung an osmotischen Stress erleichtern könnten. Immerhin stellt auch das Wachstum in Minimalmedium für Bakterien bereits einen Stress dar, da alle Nährstoffe außer der zugegebenen C- und N-Quelle limitiert sind.

4.4 Welcher Stimulus führt zur Adaptation ?

Die Beobachtung der Adaptationsregulation von BetP, die aus der Senkung der Geschwindigkeit des unidirektionalen Imports sowie in einem großen Anteil von Gegentausch an der Aktivität besteht, wirft die Frage nach dem Stimulus auf, der von BetP in dieser Phase wahrgenommen wird. So wie ein osmotischer Schock Auswirkungen auf viele physikalische Parameter der Zelle hat, sollten diese nach optimaler Anpassung an einen hyperosmotischen Schock wieder in den Ausgangszustand zurückgeführt werden. Die von einem hyperosmotischen Schock betroffenen Parameter sind (a) die externe Osmolalität, Ionenstärke und

Wasseraktivität, (b) die selben Parameter im Cytoplasma, (c) der Turgordruck, (d) die Konzentration bestimmter Ionen und Moleküle, (e) die Membranspannung und (f) eine besonders große Konzentration von Makromolekülen im Cytoplasma, auch *molecular crowding* genannt (Wood, 1999). Die externen Parameter ändern sich während der Anpassung der Zellen zumindest in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen nicht signifikant und können somit nicht Stimuli für die hier beobachtete Adaptationsregulation sein. Die intrazelluläre Ionenstärke, Konzentration bestimmter Ionen und Moleküle und die intrazelluläre Wasseraktivität sind potenzielle Stimuli der BetP-Adaptationsregulation, wie auch der Turgordruck und die Membranspannung. Diese Parameter auf einen dem Zellwachstum und der Zellvermehrung förderlichen Wert zurück zu führen, ist Ziel der Osmoregulation, weswegen sie mögliche Signale für die Deaktivierung von Importern kompatibler Solute sind. Da für einige Transporter kompatibler Solute verschiedene Varianten der Inhibition durch intern akkumuliertes Substrat postuliert wurden, wurde auch diese Hypothese für BetP überprüft. Eine weitere Möglichkeit ist die Beteiligung eines zusätzlichen sensorischen Proteins, das durch Bindung an BetP oder dessen Modifizierung eine Adaptationsregulation hervorrufen könnte.

4.4.1 Kaliumionenkonzentration und BetP-Regulation

Die Kaliumionenkonzentration ist ein interessanter Kandidat als Stimulus für die Adaptationsregulation, da gezeigt werden konnte, dass BetP in Liposomen durch hohe luminalen Kaliumkonzentrationen aktiviert wird (Rübenhagen *et al.*, 2001).

Die Aktivierung von BetP erfolgte auch in Zellen im Rahmen der Messgenauigkeit zeitgleich mit der Erhöhung der Kaliumionenkonzentration, unabhängig davon, ob die Zellen in Minimal- oder Vollmedium gewachsen waren (Abbildung 3.7, 3.8). Die Kaliumantwort war wie die Aktivierung von BetP je nach Ausmaß des hyperosmotischen Schocks verschieden stark ausgeprägt, so wie auch in Proteoliposomen höhere luminalen Konzentrationen an Kaliumionen BetP stärker aktivierten. Interessanterweise variierte das Ausmaß der Kaliumantwort stärker mit dem Wachstumsmedium der Zellen als die Höhe der Aktivierung von BetP. Bei in Minimalmedium gewachsenen Zellen trat nach Zugabe von 250 mM NaCl eine Erhöhung der BetP-Aktivität etwa um den Faktor 10 ein; die Kaliumkonzentration stieg aber nur um den Faktor 1,1 an. Sollte BetP ausschließlich durch einen Anstieg der Kaliumionenkonzentration aktiviert werden, müsste das Protein über sehr genaue sensorische Eigenschaften verfügen. Denkbar wäre daher eine Kombination von mehreren Faktoren auch bei der Aktivierung von BetP. Eine kaliumunabhängige, physiologisch relevante Aktivierung

von BetP ist dagegen keine zwangsläufige Konsequenz aus diesen Messungen, wie auch einige andere Parameter in Proteoliposomen zumindest als alleinige Aktivatoren für BetP ausgeschlossen werden konnten. Dazu gehören Faktoren im externen Kompartiment, die Membranspannung sowie im Lumen der Proteoliposomen Osmolalität, Ionenstärke und die Konzentrationen von Natrium-, Ammonium- und Cholinionen (Rübenhagen *et al.*, 2001; Schiller *et al.*, 2004a). Sowohl die hier durchgeführten Messungen als auch die mit Proteoliposomen erhaltenen Ergebnisse müssen jedoch im Zusammenhang mit dem jeweiligen System beurteilt werden: Die Bestimmung der Kaliumkonzentration über die Berechnung mittels Division der Gesamtmenge zellulären Kaliums durch das Volumen frei verfügbaren Wassers muss nicht notwendig die tatsächlichen Konzentrationsänderungen widerspiegeln: Nach einem hyperosmotischen Schock werden zumindest in *E. coli* viele sonst an Makromoleküle gebundene Kaliumionen ins Cytoplasma entlassen (McLaggan *et al.*, 1994). Dieser die cytoplasmatische Kaliumionenkonzentration erhöhende Effekt ist mit der Bestimmung der Gesamtmenge internen Kaliums nicht messbar, eine mögliche Revertierung des Effektes während der Adaptation an hyperosmotischen Stress demnach ebenfalls nicht. Proteoliposomen als artifizielles System wiederum weichen in der Zusammensetzung der Membran und des Lumens von Zellen ab und besitzen wegen ihres von der Zelle abweichenden Verhältnisses von Volumen und Oberfläche eine andere Membranspannung als Zellen. Außerdem kann in Proteoliposomen kein Turgordruck aufgebaut werden.

Eine mögliche Deaktivierung von BetP durch sinkende Konzentrationen an Kaliumionen während der Adaptation an hyperosmotischen Stress ist anhand der Daten sehr unwahrscheinlich. Zellen, die in Minimalmedium gewachsen waren, wiesen zwar während der Adaptation Kaliumkonzentrationen auf, die denen vor dem hyperosmotischen Schock vergleichbar waren, jedoch sank die Kaliumkonzentration in einem anderen Zeitrahmen als die BetP-Aktivität. Nach Schocks mit 250 und 400 mM NaCl waren die Kaliumkonzentrationen bei in Minimalmedium gewachsenen Zellen nach 5 Minuten noch erhöht, die BetP-Aktivität jedoch bereits auf einem niedrigen Niveau (vergleiche Abbildungen 3.1, 3.7). Nach einem Schock mit 740 mM NaCl war die Kaliumkonzentration über einen längeren Zeitraum erhöht als 10 Minuten, ein Zeitraum, in dem die Importgeschwindigkeit von BetP bereits wieder gesunken war. Bei den in Vollmedium gewachsenen Zellen war noch deutlicher als bei den über Nacht in Minimalmedium gewachsenen Zellen erkennbar, dass die Modulation der BetP-Aktivität während der Anpassung an hyperosmotischen Stress nicht durch ein paralleles Absinken der Kaliumkonzentration verursacht werden konnte. Hier änderten sich die Kaliumkonzentrationen im Zeitraum von 1 bis 30 Minuten nach dem hyperosmotischen

Schock kaum, BetP trat aber auch in diesen Zellen spätestens nach 10 Minuten in die Adaptationsphase ein (Abbildungen 3.5, 3.8). Gegen eine Beteiligung von Kaliumionen an der Adaptationsregulation spricht weiterhin die Tatsache, dass die Mutante BetP Δ 25, die in Proteoliposomen insensitiv gegenüber Kaliumionen war (Schiller *et al.*, 2004b) und in Zellen auch ohne hyperosmotischen Schock Betain importierte (Peter *et al.*, 1998a), trotzdem in eine Adaptationsphase eintreten konnte (Abbildung 3.11a). Somit muss es zusätzlich zur Aktivierung durch Kaliumionen eine weitere Regulationsebene geben, die bei anhaltend hoher Kaliumionenkonzentration für eine Modulation der BetP-Aktivität sorgt.

4.4.2 Inhibition durch intern akkumuliertes Substrat

Bei der Betrachtung der möglichen Inhibition osmoregulatorischer Transporter durch intern akkumuliertes Substrat muss zwischen den Modellen der einfachen Inhibition und der modifizierten Inhibition unterschieden werden. Bei der einfachen Inhibition wird der Transporter analog zur Produktinhibition metabolischer Enzyme bei einer bestimmten internen Solutkonzentration in seiner Aktivität gehemmt. Das für die Transporter aus *L. plantarum* und *L. monocytogenes* postulierte Modell der modifizierten Inhibition sieht bei osmotischem Stress eine Konformationsumwandlung vor, infolge derer die inhibitorische Bindungsstelle unzugänglich wird. Dies führt dann zur Aufhebung der Hemmung und ermöglicht eine an die Stärke des hyperosmotischen Schocks angepasste Akkumulation von kompatiblen Soluten (Glaasker *et al.*, 1998; Verheul *et al.*, 1997).

Eine einfache Inhibition von BetP durch intern akkumuliertes Substrat kommt für BetP nicht in Frage, da das Ausmaß intern akkumulierten Betains linear abhängig von der Stärke des zuvor applizierten hyperosmotischen Schocks war (Abbildung 3.9). Dieses Ergebnis schließt ebenso aus, dass die Regulation von BetP durch das transmembrane chemische Betainpotenzial beeinflusst sein könnte. Die modifizierte Inhibition als mögliches Erklärungsmodell für die Regulation von BetP konnte mit den Daten aus diesem Versuch jedoch nicht widerlegt werden.

Zwei weitere Ergebnisse sprechen im Falle von BetP dennoch gegen das Modell einer bei osmotischem Stress aufgehobenen Hemmung durch internes Substrat: die Aktivität von BetP sank auch dann, wenn den Zellen zur Adaptation an hyperosmotischen Stress kein Betain zur Verfügung stand (Abbildung 3.10). Wenn außerdem Zellen, die BetP oder BetP Δ 25 exprimierten, gleich starkem hyperosmotischen Stress ausgesetzt wurden, führte dies zu

verschieden großen Mengen intern akkumulierten Betains (Abbildung 3.11b). Falls eine Inhibition durch intern akkumuliertes Substrat eine Aktivitätsminderung von BetP verursachte, dann müsste sie bei den beiden Varianten von BetP bei verschiedenen internen Solutkonzentrationen wirken. Nicht ausgeschlossen werden konnte durch die Ergebnisse dieser Arbeit eine Inhibition durch die intern akkumulierten kompatiblen Solute Prolin und Trehalose. Allerdings sind weder Prolin noch Trehalose Substrate von BetP. Beide sind außerdem strukturell nicht eng verwandt mit Betain und daher keine nahe liegenden Inhibitoren für BetP. Unabhängig davon stellt die modifizierte Inhibition eine unnötige mechanistische Verkomplizierung dar: Wenn das Signal eines osmotischen Stresses, wie auch immer es vom Protein wahrgenommen wird, dafür dienen soll, eine inhibitorische Bindungsstelle zugänglich oder unzugänglich zu machen, könnte es auch gleich die Aktivität des Transporters regulieren. Eine zusätzliche inhibitorische Bindungsstelle wäre in diesem Fall nicht nötig.

4.4.3 Beteiligung eines weiteren Proteins an der Adaptationsregulation

Die Beteiligung eines weiteren Proteins an der Adaptationsregulation ist unwahrscheinlich. *E. coli*-Zellen, die *betP* heterolog exprimierten, importierten wie *C. glutamicum* DHPF pGTG (*betP*) nach Eintreten einer hyperosmotischen Stress-Situation zunächst schnell und danach langsam Betain. Auch der Gegentausch konnte in *E. coli* wie in *C. glutamicum* beobachtet werden. Falls der Eintritt von BetP in die Adaptationsphase durch ein Regulatorprotein beeinflusst würde, so müsste dieses Regulatorprotein auch in *E. coli* vorhanden sein und die putative Regulations- oder Bindungsstelle von BetP erkennen. Dass trotzdem die Aktivierungs- und Adaptationsregulation des Proteins im homologen und heterologen System unterschiedliche Ausmaße hatte, kann zum einen damit erklärt werden, dass *E. coli* einem geringeren osmotischen Stress ausgesetzt werden musste als *C. glutamicum*. Auch die unterschiedliche Lipidzusammensetzung der Membran kann einen Einfluss auf BetP gehabt haben, da BetP auch in Proteoliposomen unterschiedlicher Membranzusammensetzung unterschiedlich stark aktiviert wurde (Rübenhagen *et al.*, 2000).

4.4.4 Mögliche für die Adaptationsregulation relevante Stimuli

Nachdem die Beteiligung einiger putativer Stimuli an der Adaptationsregulation ausgeschlossen werden konnte, bleibt die Frage nach dem für den Eintritt von BetP in die Adaptationsphase verantwortlichen Signal. Da BetP mit zunehmender Adaptation an hyperosmotischen Stress an Aktivität verlor (Abbildungen 3.1, 3.10), sollte das verantwortliche Signal direkt auf BetP wirken und das Ausmaß der osmotischen Kompensation anzeigen.

Mögliche Kandidaten sind in diesem Zusammenhang die Membranspannung sowie Wechselwirkungen zwischen dem Protein und der Membran. BetP kann auf verschiedene Weise mit der Membran wechselwirken: die Transmembranhelices sind in den hydrophoben Teil der Membran eingebettet. Die C- und N-terminalen cytoplasmatischen Extensionen und die einzelnen Schleifen zwischen den Transmembranhelices können mit der hydrophilen Oberfläche der Membran wechselwirken. Diese Wechselwirkungen der Extensionen und Schleifen mit der Membran können ihrerseits nicht nur von der Membranstruktur, sondern auch von der cytoplasmatischen Ionenstärke und vom Hydratationsstatus von BetP beeinflusst werden. Der Hydratationsstatus wiederum ist unter anderem eine Funktion der Aktivität des cytoplasmatischen Wassers, aber auch der Menge und Art akkumulierter kompatibler Solute. Schließlich könnten auch der Hydratationsstatus selbst sowie die Ionenstärke, Osmolalität und Wasseraktivität mögliche von BetP wahrgenommene Reize sein.

Dafür, dass der für die Adaptation verantwortliche Stimulus in der Membran oder bei Protein-Membran-Wechselwirkungen zu suchen ist, spricht, dass die Wahl der Lipide bei der Rekonstitution von BetP in Proteoliposomen einen Einfluss auf die initiale Aktivität von BetP hat (Rübenhagen *et al.*, 2000). Außerdem erscheint es nach Experimenten mit Tetracain (4-Butylaminobenzoesäure-2-dimethylaminoethylester) möglich, dass der Stimulus nicht nur an der Oberfläche, sondern auch im hydrophoben Teil der Membran zu suchen ist: BetP konnte in Proteoliposomen und in Zellen, wie auch der primäre Transporter OpuA aus *L. lactis* in Proteoliposomen, durch Zugabe des kationischen amphiphilen Moleküls Tetracain aktiviert werden (Rübenhagen *et al.*, 2000; Steger, 2003; van der Heide & Poolman, 2000b; van der Heide *et al.*, 2001). Amphiphile, geladene Moleküle wie Tetracain können nicht nur die Oberflächenladung der Membran verändern, sondern auch deren Struktur und dadurch die Membranspannung. In der Folge kann das Gleichgewicht zwischen aktiven und inaktiven Konformationen von Membranproteinen verschoben werden (Cantor, 1999). Ein Einfluss der veränderten Membranspannung nach einem hyperosmotischen Schock auf die Aktivität von Membranproteinen wurde bereits für mehrere Transporter beschrieben (Roth *et al.*, 1985a,b; Houssin *et al.*, 1990), und dieser Effekt könnte auch für die kurzzeitige niedrigere Aktivität

des Glutaminimporters aus *C. glutamicum* nach einem hyperosmotischen Schock verantwortlich sein (Abbildung 3.3). So, wie diese Proteine nach dem hyperosmotischen Schock in eine weniger aktive Konformation umgewandelt worden sein könnten, wäre es möglich, dass ein Transporter für kompatible Solute gerade erst nach einer solche Änderung der Membranstruktur eine Konformationsumwandlung zur voll aktiven Form erfährt. Dieses Modell würde für BetP bedeuten, dass das Protein nach einem hyperosmotischen Schock sowohl durch die Erhöhung der Kaliumionenkonzentration als auch durch die veränderte Membranstruktur aktiviert würde. Da während der Überwindung des hyperosmotischen Stresses die vorige Membranstruktur wieder hergestellt wird, könnte BetP dann auch bei fortwährender erhöhter Konzentration der stimulierenden Kaliumionen nicht mehr voll aktiv sein, da die Membranstruktur im adaptierten und folglich wieder ungestressten Zustand das Gleichgewicht zwischen der hypothetischen aktiveren und inaktiveren Struktur von BetP wieder zur inaktiveren Form verschöbe. Dieses Modell steht im Einklang mit der Beobachtung, dass die BetP-Aktivität langsamer sank, wenn kein Betain zur Überwindung der hyperosmotischen Schocks bereitgestellt wurde (Abbildung 3.10). Analog dazu leistete der Import von Betain in *E. coli* einen Beitrag zur Revertierung der beobachteten niedrigeren Aktivität einiger Transportsysteme nach einem hyperosmotischen Schock (Roth *et al.*, 1985b; Houssin *et al.*, 1990). Dieses Modell scheint im Widerspruch zu der Beobachtung zu stehen, dass in Proteoliposomen Änderungen der luminalen Kaliumionenkonzentration, nicht jedoch Änderungen der Membranspannung einen Einfluss auf die Aktivität des Transporters hatten. Jedoch sind Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden kein perfektes Modell für eine intakte Membran aus *C. glutamicum*, da sie eine andere Lipidzusammensetzung, keine Membranproteine und wegen des geringen Durchmessers eine andere Membranspannung besitzen. Der Durchmesser der Liposomen in einer Größenordnung von 100 bis 400 nm nach Extrusion durch einem 400 nm großen Filter (van der Heide *et al.*, 2001; Ertel *et al.*, 1993) bedeutet für die Lipiddoppelschicht eine starke Krümmung. Aussagen aus Proteoliposomen, die die Membranstruktur betreffen, lassen sich daher schwer auf die Situation in Zellen übertragen. Eine weitere Möglichkeit der Regulation von BetP sind Änderungen der Wechselwirkungen der cytoplasmatischen Extensionen und Schleifen des Proteins mit der Membranoberfläche. Der Einfluss der cytoplasmatischen Extensionen auf die Regulation von BetP wurde bereits beschrieben (Peter *et al.*, 1998a), wobei der Schwerpunkt auf der C-Extension lag (Schiller *et al.*, 2004b; Abbildung 3.11 und Tabelle 3.4). So wie die C-terminale Verkürzung des Proteins um 25 Aminosäuren zu einer Aktivität des Proteins ohne hyperosmotischen Schock und ohne Erhöhung der Kaliumkonzentration führte, so waren nach N-terminaler Verkürzung des

Proteins höhere externe Osmolalitäten erforderlich, um eine maximale Aktivierung des Proteins zu erreichen. Die direkte Beteiligung der C-terminalen 25 Aminosäuren an der Wahrnehmung von Kaliumionen konnte gezeigt werden (Schiller *et al.*, 2004b).

Eine geeignete Methode, putative Änderungen von Wechselwirkungen der terminalen Extensionen mit der Membran nachzuvollziehen, wäre die Messung der Fluoreszenzlebensdauer von Fluorophoren. Diese Eigenschaft hängt von der Polarität der Umgebung der Fluorophore ab und könnte sich bei einer Anlagerung des Fluorophors an die Membran ändern. Die Fluoreszenz der Aminosäuren aus BetP kann hierzu allerdings nicht genutzt werden, da die Fluoreszenz der 14 Tryptophanreste im Protein Änderungen der Fluoreszenz einzelner Reste überdecken würde. Eine Alternative stellt die Bindung von Fluoreszenzfarbstoffen an Cysteinreste von überexprimiertem und gereinigtem BetP und anschließender Messung in Proteoliposomen dar. Aus früheren Arbeiten standen bereits Einzelcysteinmutanten von BetP zur Verfügung, die sich für die Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen eigneten (Rübenhagen *et al.*, 2001; Schiller *et al.*, 2004b). Die Bindung der cytoplasmatischen Extensionen von BetP an die liposomale Membran sowie deren Dissoziation müssten Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften dort gebundener Farbstoffmoleküle zur Folge haben. Für Experimente mit Proteoliposomen ist zu jedoch beachten, dass die Aufrechterhaltung eines definierten Natriumionenpotenzials, welches zur Aktivität von BetP erforderlich ist, über einen längeren Zeitraum schwierig ist. Daher können weitere, eventuell auch der Adaptationsregulation zuzuordnende Stimuli nur dann erkannt werden, wenn sie auch während der Aktivierung Einfluss auf BetP ausüben. Das erschwert wiederum die Differenzierung dieser Einflüsse von der Kaliumwahrnehmung.

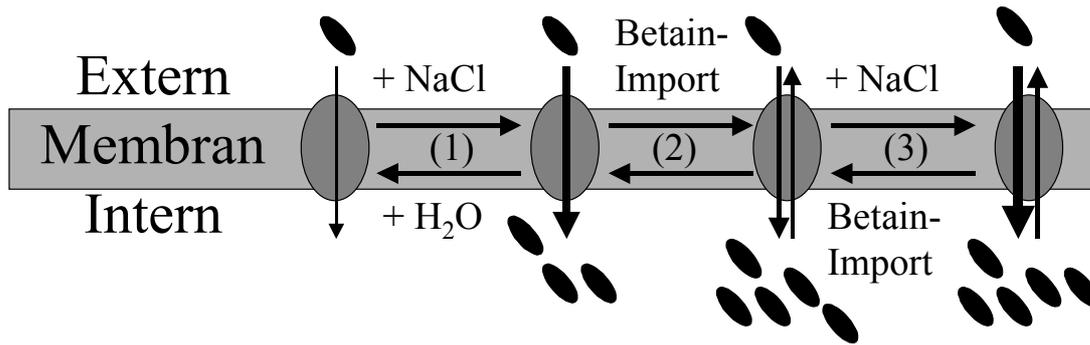
Die Etablierung eines Systems mit fluoreszenzmarkiertem BetP in Proteoliposomen wurde in zwei alternativen Ansätzen vergeblich versucht (Daten nicht gezeigt). Im ersten Ansatz wurde BetP zunächst spezifisch mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Das markierte BetP-Protein sollte dann in Proteoliposomen rekonstituiert werden. Der zweite Ansatz sah zuerst die Rekonstitution des Proteins und eine anschließende Markierung vor. Für den ersten Ansatz konnten Einzel-Cysteinmutanten von BetP erfolgreich markiert und die markierten Proteine an einer Affinitätssäule aufgereinigt werden. Die Rekonstitution der markierten Proteine in Proteoliposomen scheiterte dann an ihrer quantitativen Bindung an die zur Rekonstitution zugegebenen Polystyrolkugeln. Die Polystyrolkugeln dienen im Protokoll der Rekonstitution von Membranproteinen eigentlich dazu, durch eine hochaffine Bindung die Detergenzien, in denen Proteine und Lipide solubilisiert sind, aus dem System zu entziehen und damit die Insertion der hydrophoben Proteine in die Lipide zu bewirken. Die

Wahl von Dialyse, Gel- oder Ultrafiltration zur alternativen Beseitigung der Detergenzien unter Umgehung der Verwendung von Polystyrolkugeln schied aus, da die zur Solubilisierung von Proteinen und Lipiden verwendeten Detergenzien n-Dodecyl- β -D-maltosid und Triton X-100 beide eine sehr niedrige kritische Mizellenkonzentration besitzen. Die Wahl alternativer, dialysierbarer Detergenzien wurde zunächst nicht erwogen, da die Rekonstitution von BetP auf die Detergenzien n-Dodecyl- β -D-maltosid und Triton X-100 optimiert war. Bei Wahl eines neuen Detergens müsste die gesamte Aufreinigungsprozedur inklusive der Funktionstests neu etabliert werden. Statt dessen wurde der alternative Ansatz der Markierung von BetP in bereits rekonstituierten Proteoliposomen gewählt. Nach der Rekonstitution der Proteoliposomen sollte der Farbstoff hinzugegeben und dann mittels Dialyse oder Gelfiltration abgetrennt werden. Die Zugabe des Farbstoffes zu den Proteoliposomen führte jedoch zu unspezifischen Reaktionen des thiolgruppenreaktiven Farbstoffes mit den Lipiden. Als Ursache hierfür wurden Kreuzreaktionen in Form kovalenter Bindungen mit den im Überschuss vorhandenen Aminogruppen des Phosphatidylethanolamins oder nichtkovalenter Bindungen des hydrophoben Chromophors mit den hydrophoben Anteilen der Lipide vermutet. Eine Abtrennung des Farbstoffes gelang nicht. Als Alternative bliebe daher die bisher nicht berücksichtigte Wahl anderer Detergenzien für die Aufreinigung des Proteins und die Präparation der Liposomen, was die Reetablierung des Rekonstitutionsprozesses mit einschliesse. Eine andere Möglichkeit wäre die Rekonstitution des markierten Proteins zunächst in Liposomen aus dem nicht stickstoffhaltigen Lipid Dioleoylphosphatidylglycerin. Dies käme jedoch nur in Frage, wenn die in den bisherigen Experimenten beobachtete Bindung des thiolgruppenspezifischen Farbstoffs an die Stickstoff-haltigen Lipide kovalenter Natur war. Lag jedoch eine nichtkovalente Bindungen des Farbstoffes an die Lipide vor, wäre eine solche Bindung auch an die strukturell nah verwandten Stickstoff-freien Lipide zu erwarten und ein anderer Farbstoff müsste gewählt werden. Dieser Ansatz ist nicht vielversprechend, da die erhältlichen Thiol-reaktiven Fluoreszenzfarbstoffe sämtlich über hydrophobe Chromophore verfügen. Gelänge jedoch nach Anfärbung von rekonstituiertem BetP die Abtrennung ungebundenen Farbstoffes, müssten in einem weiteren Schritt die aus Dioleoylphosphatidylglycerin und markiertem BetP bestehenden Proteoliposomen mit Liposomen aus *E. coli*-Lipiden fusioniert werden, da BetP in Proteoliposomen, die nur Dioleoylphosphatidylglycerin als Lipid besitzen, nicht aktiv ist. Nach erfolgreicher Etablierung des Systems wäre diese Methode nicht nur geeignet, um Protein-Membran-Wechselwirkungen zu beurteilen, sondern auch, um Informationen über Konformationsänderungen des Proteins im hydrophoben Zentrum der Membran zu gewinnen, falls davon die Umgebung

eines Farbstoffes betroffen wäre, der an einen im Membranbereich inserierten Cysteinrest gebunden wurde. Sie könnte daher ein wichtiger Schlüssel zur weiteren Aufklärung der Mechanismen der Wahrnehmung von osmotischem Stress durch BetP sein.

Die weiteren putativen Stimuli für die Adaptationsregulation von BetP, namentlich Wasseraktivität, Osmolalität, Ionenstärke und Hydratationsstatus von BetP, sind, sofern sie keine spezifischen Änderungen der Wechselwirkungen zwischen den cytoplasmatischen Domänen und der Membran provozieren, teilweise schwer voneinander zu unterscheiden, da sie Funktionen voneinander sind. Da die luminaire Ionenstärke und Osmolalität hinsichtlich der Aktivierung von BetP in Proteoliposomen als Stimuli ausgeschlossen werden konnten, während die Kaliumkonzentration als aktivierender Stimulus definiert wurde, ist ein Einfluss der damit zusammenhängenden Parameter auf die Adaptationsregulation ebenfalls nicht besonders wahrscheinlich. Zwar wurde in Proteoliposomen auch kein Hinweis auf die Membranspannung als möglicher Stimulus für die BetP-Aktivierung gewonnen, jedoch wurde die eingeschränkte Eignung des proteoliposomalen Systems für die Beurteilung dieses Parameters bereits diskutiert. Parameter, die für die beiden anderen bisher in Proteoliposomen rekonstituierten Transporter als aktivierend definiert wurden, wie eine hohe luminaire Ionenstärke für OpuA aus *L. lactis* (van der Heide *et al.*, 2001) und eine hohe luminaire Konzentration unter anderem von Kationen für ProP aus *E. coli*, sind zudem schwierig als Stimuli für eine Adaptationsregulation von BetP zu identifizieren: die Adaptationsregulation von BetP in Proteoliposomen zu untersuchen, ist, wie bereits erwähnt, wegen der mangelnden Möglichkeit der Aufrechterhaltung des Membranpotenzials über einen längeren Zeitraum schwierig. In Zellen dagegen sind diese Parameter nur schwer isoliert von anderen Parametern zu beobachten.

Nach Betrachtung der für die Adaptationsregulation in Frage kommenden Stimuli erscheint folgendes Szenario plausibel: Nach einem hyperosmotischen Schock wird BetP aktiviert (Reaktion 1 in Abbildung 4.1), indem es an der C-terminalen Extension die erhöhte Kaliumkonzentration wahrnimmt (Schiller *et al.*, 2004b). Gleichzeitig zeigt ein anderer Stimulus an, dass die Zelle nicht an die nun herrschenden osmotischen Bedingungen adaptiert



Situation	A	B	C	D
BetP-Aktivität	basal	hoch	niedrig	hoch
$[K^+]_{\text{intern}}$	niedrig	hoch	hoch	hoch
2. Stimulus	inaktiviert	aktiviert	inaktiviert	aktiviert
$[GB]_{\text{intern}}$	niedrig	ansteigend	hoch	hoch, ansteigend
Gegentausch	nein	kaum	ja	ja
Salzschock	nein	1. Schock	überwunden	2. Schock

Abbildung 4.1: Aktivitätsmodell von BetP

Ausgehend von basaler Aktivität bei niedriger Osmolalität (A) kann BetP durch einen hyperosmotischen Schock aktiviert werden (Reaktion 1; vergleiche Abbildung 3.1). BetP nimmt eine hohe interne Kaliumkonzentration wahr, und der zweite Stimulus zeigt osmotischen Stress an (B). Daher ist die Aktivität hoch. Die Aktivität kann revertiert werden, indem die Umgebung der Zellen durch Zugabe von Wasser wieder die ursprüngliche, niedrige Osmolalität erlangt (Rückreaktion 1, vgl. Abb. 3.4). Nach Adaptation an den hyperosmotischen Stress (2) bleibt die Kaliumkonzentration zunächst hoch, der zweite Stimulus zeigt jedoch Adaptation an (C). Die BetP-Aktivität sinkt auf ein niedriges Niveau, und die hohe interne Betainkonzentration verursacht Gegentausch. Nach einem zweiten hyperosmotischen Schock wird BetP erneut aktiviert (Reaktion 3, vergleiche Abbildung 3.2). Die Situation D entspricht von der BetP-Aktivität Situation B, jedoch hat der Gegentausch einen signifikanten Anteil an der BetP-Aktivität, da in dieser Situation die interne Betainkonzentration hoch ist. Wenn nach erfolgter Adaptation an hyperosmotischen Stress die interne Kaliumkonzentration wieder sinken sollte, bedeutete das einen direkten Übergang von Situation C zu Situation A. Die externe Substratkonzentration bleibt während des Versuches gleich.

ist (Situation B). Dieser zweite Stimulus beeinflusst BetP direkt. Es ist denkbar, dass eine Verformung der Membran auf den hydrophoben Kern des Proteins oder auf die cytoplasmatischen Extensionen und Schleifen wirkt. Alternativ kann der Hydratationsstatus von BetP wegen der Aufkonzentration der Solute im Cytoplasma verändert sein, was sich zusätzlich auf die Wechselwirkungen zwischen den Extensionen oder Schleifen und der Membran auswirken kann. Nach Adaptation an den hyperosmotischen Stress (Reaktion 2) ist zwar die Kaliumkonzentration noch erhöht, aber der zweite Stimulus, ob Membranspannung oder Hydratationszustand des Proteins, zeigt osmotische Kompensation an. BetP ist daher mit nur noch mit verringerter Geschwindigkeit aktiv (Situation C). Ein großer Teil des von BetP

noch importierten Betains gelangt zudem durch den Gegentausch wieder aus der Zelle. Der Gegentausch ist dabei nicht Ergebnis einer Regulation, sondern ein inhärenter Bestandteil der BetP-Aktivität. Der Gegentausch kommt jedoch erst zur Geltung, wenn bei hohen internen Betainkonzentrationen die interne Substrat-Bindestelle gesättigt ist. Ein zweiter hyperosmotischer Schock bewirkt die erneute Aktivierung von BetP (Reaktion 3), da der zweite Stimulus erneut osmotischen Stress anzeigt (Situation D). Die Aktivität von BetP nach dem zweiten hyperosmotischen Schock entspricht der nach dem ersten hyperosmotischen Schock. Da die interne Betainkonzentration nun jedoch hoch ist, ist wegen der Sättigung der internen Bindungsstelle für Betain auch Gegentausch zu beobachten und der Nettoimport von Betain ist geringer als nach dem ersten hyperosmotischen Schock. Im Grundzustand (Situation A), wenn weder die interne Konzentration an Kaliumionen erhöht ist noch das zweite Signal osmotischen Stress anzeigt, zeigt BetP nur eine sehr geringe basale Aktivität.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Regulation des Betaintransporters BetP aus *C. glutamicum* während der Adaptation der Bakterien an hyperosmotischen Stress untersucht. BetP, das in ungeschockten Zellen nur eine geringe basale Aktivität aufwies, importierte nach der plötzlichen Einstellung hyperosmotischer Bedingungen in der Umgebung mit hoher Geschwindigkeit Betain. Einige Minuten später trat eine Verlangsamung der Proteinaktivität ein und es wurde nur noch geringer Nettoimport von Betain beobachtet. Die Menge des zu diesem Zeitpunkt importierten Betains war linear abhängig von der Stärke des hyperosmotischen Schocks. Mit Doppelmarkierungsexperimenten wurde gezeigt, dass die geringe Netto-Importgeschwindigkeit von Betain in dieser sogenannten Adaptationsphase zwei Ursachen hatte. Zum einen verlangsamte sich die Gesamtaktivität von BetP, entsprechend der unidirektionalen Betain-Importgeschwindigkeit. Zum anderen machte der Substrat-Gegentausch einen Anteil von zwei Dritteln der BetP-Aktivität aus, da die interne Substratbindungsstelle zunehmend gesättigt wurde. Ein zweiter hyperosmotischer Schock führte zu erneutem schnellem Betainimport durch BetP. Auch in dieser Situation machte der Gegentausch zwei Drittel der BetP-Aktivität aus. Die Beteiligung von separaten Carriern oder mechanosensitiven Kanälen an der Regulation der cytoplasmatischen Betainkonzentration konnte ausgeschlossen werden, ebenso wie die Hypothese, Aktivitätsänderungen von BetP seien auf Änderungen des elektrochemischen Natriumionenpotenzials über die Membran zurückzuführen.

Untersuchungen zur Adaptationsregulation von BetP bewiesen die Existenz eines zweiten auf das Protein wirkenden regulatorischen Stimulus, da Kaliumionen, deren Konzentrationsanstieg zur Aktivierung von BetP führt, nicht an der Adaptationsregulation beteiligt waren. BetP wurde von intern akkumuliertem Substrat weder direkt gehemmt, noch konnten Hinweise auf eine modifizierte, bei hyperosmotischem Stress aufgehobene Inhibition durch Betain gefunden werden. Auch die Beteiligung eines weiteren Proteins an der Regulation von BetP ist unwahrscheinlich. Es wird vermutet, dass der den Eintritt von BetP in die Adaptationsphase bewirkende Stimulus direkt auf den Transporter wirkt. Änderungen in der Membranstruktur bei hyperosmotischem Stress könnten eine Konformationsumwandlung des Transporters in eine aktivere Form bewirken, die dann während der Adaptation revertiert wird. Ebenfalls plausibel wäre, dass die Aktivität von BetP durch den Hydratationsstatus des Proteins beeinflusst wird, der sich während der Adaptation der Zellen an den hyperosmotischen Stress wieder dem Zustand vor der Aktivierung von BetP annähert.

6 Literatur

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

Bayan, N., Houssin, C., Chami, M., Leblon, G. (2003). Mycomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications. *J. Biotechnol.* **104** (1-3), 55-67.

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.

Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Biochemistry and Physiology* **37** (8), 911-917.

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.

Bouvier, J., Bordes, P., Romeo, Y., Fourcans, A., Bouvier, I., Gutierrez, C. (2000). Characterization of OpuA, a glycine-betaine uptake system of *Lactococcus lactis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2** (2), 199-205.

Burger, U. (2002). Struktur- und Funktionsuntersuchungen am osmotisch regulierten Transporter BetP aus *Corynebacterium glutamicum*. Doktorarbeit, Universität zu Köln.

Cairney, J., Booth, I. R., Higgins, C. F. (1985a). *Salmonella typhimurium ProP* gene Encodes a Transport System for the Osmoprotectant Betaine. *J. Bacteriology* **164** (3), 1218-1223.

Cairney, J., Booth, I. R., Higgins, C. F. (1985b). Osmoregulation of Gene Expression in *Salmonella typhimurium*: *ProU* Encodes an Osmotically Induced Betaine Transport System. *J. Bacteriology* **164** (3), 1224-1232.

Cantor, R. S. (1999). Solute modulation of conformational equilibria in intrinsic membrane proteins: apparent "Cooperativity" without binding. *Biophys. J.* **77** (5), 2643-2647.

Cayley, D. 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.* **76**, 1748-1764.

Culham, D. E., Lasby, B., Marangoni, A. G., Milner, J. L., Steer, B. A., van Nues, R. W., Wood, J. M. (1993). Isolation and sequencing of *Escherichia coli* gene proP reveals unusual structural features of the osmoregulatory proline/betaine transporter, ProP. *J. Mol. Biol.* **229** (1), 268-276.

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.

Culham, D. E., Henderson, J., Crane, R. A., Wood, J. M. (2003). Osmosensor ProP of *Escherichia coli* responds to the concentration, chemistry, and molecular size of osmolytes in the proteoliposome lumen. *Biochemistry* **42** (2), 410-420.

Davis, B. D., Mingioli, E. S. (1950). Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B12. *J. Bacteriology* **60**, 17-28.

Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmid, R., Bakker, E. P. (1988). Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch. Microbiol.* **150** (4), 348-357.

Eichler, K., Bourgis, F., Buchet, A., Kleber, H. P., Mandrand-Berthelot, M. A. (1994). Molecular characterization of the cai operon necessary for carnitine metabolism in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **13** (5), 775-786.

- Ertel, A., Marangoni, A. G., Marsh, J., Hallett, F. R., Wood, J. M.** (1993). Mechanical properties of vesicles. I. Coordinated analysis of osmotic swelling and lysis. *Biophys. J.* **64** (2), 426-434.
- Farwick, M., Siewe, R. M., Krämer, R.** (1995). Glycine Betaine Uptake after Hyperosmotic Shift in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **177** (16), 4690-4695.
- Fraser, K. R., Harvie, D., Coote, P. J., O'Byrne, C. P.** (2000). Identification and characterization of an ATP binding cassette L-carnitine transporter in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4696-4704.
- Galinski, E. A., Herzog, R. M.** (1990). The role of trehalose as a substitute for nitrogen-containing compatible solutes (*Ectothiorhodospira halochloris*). *Arch. Microbiol* **153**, 607-613.
- Glaasker, E., Konings, W. N., Poolman, B.** (1996a). Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **178** (3), 575-582.
- Glaasker, E., Konings, W. N., Poolman, B.** (1996b). Glycine betaine fluxes in *Lactobacillus plantarum* during osmostasis and hyper- and hypo-osmotic shock. *J. Biol. Chem.* **271** (17), 10060-10065.
- Glaasker, E., Heuberger, E. H., Konings, W. N., Poolman, B.** (1998). Mechanism of osmotic activation of the quaternary ammonium compound transporter (QacT) of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **180** (21), 5540-5546.
- Grothe, S., Krogsrud, R. L., McClellan, D. J., Milner, J. L., Wood, J. M.** (1986). Proline transport and osmotic stress response in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **166** (1), 253-259.
- 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. Influences of growth rate on the intracellular concentration of proline, glutamate and trehalose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 496-500.

Haardt, M., Kempf, B., Faatz, E., Bremer, E. (1995). The osmoprotectant proline betaine is a major substrate for the binding-protein-dependent transport system ProU of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **246**, 783-786.

van der Heide, T., Poolman, B. (2000a). Glycine betaine transport in *Lactococcus lactis* is osmotically regulated at the level of expression and translocation activity. *J. Bacteriol.* **182** (1), 203-206.

van der Heide T., Poolman B. (2000b). Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97** (13), 7102-7106.

van der Heide, T., Stuart, M. C. A., Poolman, B. (2001). On the osmotic signal and osmosensing mechanism of an ABC transport system for glycine betaine. *EMBO J.* **20** (24), 7022-7032.

Hottes, A. K., Meewan, M., Yang, D., Arana, N., Romero, P., McAdams, H. H., Stephens, C. (2004). Transcriptional profiling of *Caulobacter crescentus* during growth on complex and minimal media. *J. Bacteriol.* **186** (5), 1448-1461.

Houssin, C., Eynard, N., Shechter, E., Ghazi, A. (1991). Effect of osmotic pressure on membrane energy-linked functions in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1056** (1), 76-84.

Kappes, R. M., Kempf, B., Bremer, E. (1996). Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. *J. Bacteriol.* **178** (17), 5071-5079.

Kempf, B., Bremer, E. (1995). OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **270** (28), 16701-16713.

Kinoshita, S., Ukada, S., Shimono, M. (1957). Studies of the amino acid fermentation, I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **3**, 173-185.

Ko, R., Tombras Smith, L. (1999). Identification of an ATP-driven, osmoregulated glycine betaine transport system in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4040-4048.

Koch, A. L. (1983). The surface stress theory of microbial morphogenesis. *Adv. Microb. Physiol.* **24**, 301-366.

Konings, W. N. (2002). The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82** (1-4), 3-27.

Koo, S. P., Higgins, C. F., Booth, I. R. (1991). Regulation of compatible solute accumulation in *Salmonella typhimurium*: evidence for a glycine betaine efflux system. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2617-2625.

Lamark, T., Kaasen, I., Eshoo, M. W., Falkenberg, P., McDougall, J., Strøm, A. R. (1991). DNA sequence and analysis of the bet genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5** (5), 1049-1064.

Larsen, P. I., Sydnes, L. K., Landfald, B., Strøm, A. R. (1987). Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose. *Arch. Microbiol.* **147** (1), 1-7.

Leuchtenberger, W. (1996). Technical Production and Use of Amino Acids. In: Rehm, H. J., Reed, G., Pühler, A., Stadler, P. (Editoren), *Biotechnology* **6**, VCH, Weinheim, S. 465-502.

Martin, D. D., Ciulla, R. A., Roberts, M. F. (1999). Osmoadaptation in archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (5), 1815-1825.

- McLaggan, D., Naprstek, J., Buurman E. T., Epstein, W.** (1994). Interdependence of K⁺ and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269** (3), 1911-1917.
- McClelland, M., Sanderson, K. E., Spieth, J., Clifton, S. W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, C., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., Sun, H., Florea, L., Miller, W., Stoneking, T., Nhan, M., Waterston, R., Wilson, R. K.** (2001). Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**, 852-856
- Nottebrock, D., Meyer, U., Krämer, R., and Morbach, S.** (2003). Molecular and biochemical characterization of mechanosensitive channels in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **218**, 305-309.
- Obis, D., Guillot, A., Gripon, J. C., Renault, P., Bolotin, A., Mistou, M. Y.** (1999). Genetic and biochemical characterization of a high-affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* reveals a new functional organization within bacterial ABC transporters. *J. Bacteriol.* **181** (20), 6238-6246.
- Paustian, M. L., May, B. J., Kapur, V.** (2002). Transcriptional response of *Pasteurella multocida* to nutrient limitation. *J. Bacteriol.* **184** (13), 3734-3739.
- 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** (17), 5229-5234.
- Peter, H., Bader, A., Burkovski, A., Lambert, C., Krämer, R.** (1997). Isolation of the *putP* gene of *Corynebacterium glutamicum* and characterization of a low-affinity uptake system for compatible solutes. *Arch. Microbiol.* **168** (2), 143-151.
- 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** (5), 2567-2574.

Peter, H., Weil, B., Burkovski, A., Krämer, R., Morbach, S. (1998b). *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: identification, sequencing, and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP. *J. Bacteriol.* **180** (22), 6005-6012.

Poolman, B., Glaesker, E. (1998). Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol.* **29** (2), 397-407.

Pourkomialian, B., Booth, I. R. (1992). Glycine betaine transport by *Staphylococcus aureus*: evidence for two transport systems and for their possible roles in osmoregulation. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 2515-2518.

Pourkomialian, B., Booth, I.R. (1994). Glycine betaine transport by *Staphylococcus aureus*: evidence for feedback regulation of the activity of the two transport systems. *Microbiology* **140**, 3131-3138.

Racher, K. I., Voegelé, R. T., Marshall, E. V., Culham, D. E., Wood, J. M., Jung, H., Bacon, M., Cairns, M. T., Ferguson, S. M., Liang, W.-J., Henderson, P. J. F., White, G., Hallett, F. R. (1999). Purification and reconstitution of an osmosensor: transporter ProP of *Escherichia coli* senses and responds to osmotic shifts. *Biochem.* **38**, 1676-1684.

Racher, K. I., Culham, D. E., Wood, J. M. (2001). Requirements for Osmosensing and Osmotic Activation of Transporter ProP from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **40** (24), 7324-7333.

van der Rest, M. E., Lange, C., Molenaar, D. (1999). A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52** (4), 541-545.

Rönsch, H., Krämer, R., Morbach, S. (2003). Impact of osmotic stress on volume regulation, cytoplasmic solute composition and lysine production in *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B. *J. Biotechnol.* **104** (1-3), 87-97.

- Roth, W. G., Leckie, M. P., Dietzler, D. N.** (1985a). Osmotic stress drastically inhibits active transport of carbohydrates by *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126** (1), 434-441.
- Roth, W. G., Porter, S. E., Leckie, M. P., Porter, B. E., Dietzler, D. N.** (1985b). Restoration of cell volume and the reversal of carbohydrate transport and growth inhibition of osmotically upshocked *Escherichia coli*. *Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126** (1), 442-449.
- Rottenberg, H.** (1979). The measurement of membrane potential and ΔpH 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^+ . *EMBO J.* **20** (19), 5412-5420.
- Ruffert, S., Lambert, C., Peter, H., Wendisch, V. F., and Krämer, R.** (1997). Efflux of compatible solutes in *Corynebacterium glutamicum* mediated by osmoregulated channel activity. *Eur. J. Biochem.* **247**, 572-580.
- Saier, M. H. Jr.** (2000). Families of transmembrane transporters selective for amino acids and their derivatives. *Microbiology* **146**, 1775-1795.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Schiller, D., Krämer, R., Morbach, S.** (2004a). Cation specificity of osmosensing by the betaine carrier BetP of *Corynebacterium glutamicum*. *FEBS Lett.* **563** (1-3), 108-112.

Schiller, D., Rübenhagen, R., Krämer, R., Morbach, S. (2004b). The C-Terminal Domain of the Betaine Carrier BetP of *Corynebacterium glutamicum* Is Directly Involved in Sensing K^+ as an Osmotic Stimulus. *Biochemistry*, **43** (19), 5583-5591.

Siewe, R. M., Weil, B., Krämer, R. (1995). Glutamine uptake by a sodium-dependent secondary transport system in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch Microbiol* **164**, 98-103.

Sleator, R. D., Gahan, C. G., Abee, T., Hill, C. (1999). Identification and disruption of BetL, a secondary glycine betaine transport system linked to the salt tolerance of *Listeria monocytogenes* LO28. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (5), 2078-2083.

Stackebrandt, E., Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 479-491.

Steger, R. (2003). Vergleichende Studien zur Aktivitätsregulation osmosensitiver Transporter aus *Corynebacterium glutamicum*. Doktorarbeit, Universität zu Köln.

Stimeling, K. W., Graham, J. E., Kaenjak, A., Wilkinson, B. J. (1994). Evidence for feedback (trans) regulation of, and two systems for, glycine betaine transport by *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* **140**, 3139-3144.

Stirling, D. A., Hulton, C. S., Waddell, L., Park, S. F., Stewart, G. S., Booth, I. R., Higgins, C. F. (1989). Molecular characterization of the *proU* loci of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* encoding osmoregulated glycine betaine transport systems. *Mol. Microbiol.* **3** (8), 1025-1038.

Sukharev, S. I., Blount, P., Martinac, B., Kung, C. (1997). Mechanosensitive channels of *Escherichia coli*: the MscL gene, protein, and activities. *Annu. Rev. Physiol.* **59**, 633-657.

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

- Tao, H., Bausch, C., Richmond, C., Blattner, F. R., Conway, T.** (1999). Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. *J. Bacteriol.* **181** (20), 6425-6440.
- Touzé, T., Gouesbet, G., Boiangiu, C., Jebbar, M., Bonnassie, S., Blanco, C.** (2001). Glycine betaine loses its osmoprotective activity in a *bspA* strain of *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **42** (1), 87-99
- Varela, C., Agosin, E., Baez, M., Klapa, M., Stephanopoulos, G.** (2003). Metabolic flux redistribution in *Corynebacterium glutamicum* in response to osmotic stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60** (5), 547-555.
- Verheul, A., Glaasker, E., Poolman, B., Abee, T.** (1997). Betaine and L-carnitine transport by *Listeria monocytogenes* Scott A in response to osmotic signals. *J. Bacteriol.* **179** (22), 6979-6985.
- Weinand, M.** (2004). Expressionsregulation von Transportern kompatibler Solute in *Corynebacterium glutamicum*. Doktorarbeit, Universität zu Köln.
- Whatmore, A. M., 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.
- Whatmore, A. M., Reed, R. H.** (1990). Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K^+ in turgor regulation. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 2521-2526.
- White, G. F., Racher, K. I., Lipski, A., Hallett, F. R., Wood, J. M.** (2000). Physical properties of liposomes and proteoliposomes prepared from *Escherichia coli* polar lipids. *Biochimica et Biochim. Biophys. Acta* **1468** (1-2), 175-186.
- Wolf, A., Krämer, R., Morbach, S.** (2003). Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and their significance in response to osmotic stress. *Mol. Microbiol.* **49** (4), 1119-1134.

Wood, J. M. (1999). Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63** (1), 230-262.

Ziegler, C., Morbach, S., Schiller, D., Krämer, R., Tziatzios, C., Schubert, D., Kühlbrandt, W. (2004). Projection Structure and Oligomeric State of the Osmoregulated Sodium/Glycine Betaine Symporter BetP of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Mol. Biol.* **337** (5), 1137-1147.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer danke ich für die Überlassung des Themas, die intensive wissenschaftliche Begleitung und die engagierte Betreuung dieser Arbeit.

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

Meiner Arbeitsgruppenleiterin Frau Dr. Susanne Morbach danke ich herzlich für die Betreuung dieser Arbeit, viele gute Tipps und ihr stets für Fragen aller Art offenes Ohr.

Den jetzigen und ehemaligen Mitgliedern aus der Osmo-Gruppe Andreas, Dirk, Eva, Henrike, Martin, Nina, Nuran, Oliver, Ralf, Udo und Ute, den Nachbarn aus meinem ersten Labor Andrea, Astrid, Christian, Christian, Frank, Gregor, Kay, Marit, Martin, Matthias und Suna, meinen Praktikanten Paul, Alja und Susanne und allen aus den übrigen Arbeitsgruppen danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die viele Hilfen, die die Anfertigung dieser Arbeit befördert und erleichtert haben.

Für die große Hilfe bei der Lösung der natürlich immer dringenden technischen und anderen Probleme, die während dieser Arbeit auftraten, möchte ich mich ganz herzlich bei Arthur, Frau Benova, Fritz, Gabi, Hamide, Manfred, Herrn Pyschny und Uwe bedanken.

Herzlichen Dank auch an meine Kooperationspartner Dr. Kerstin Diekert von der Firma Iongate in Frankfurt am Main und Dr. Thomas Gensch vom Forschungszentrum Jülich.

Schließlich möchte ich meinen Eltern danken, die mich jederzeit uneingeschränkt unterstützt haben.

Erklärung

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

Keine Teilpublikationen

Lebenslauf

Name: Johannes Botzenhardt
Adresse: Tempelstraße 19, 50679 Köln
Geboren: 23.10.1977 in Dallas/Tx (USA)
Konfession: evangelisch
Familienstand: ledig, kinderlos

Schulausbildung

1983-1984 Wilhelmschule, Bad Wildbad (Schwarzwald)
1984-1987 Schule an der Freiligrathstraße, Bremen
1987-1995 Ökumenisches Gymnasium zu Bremen

Studium und Promotion

WS1995 - SS 2000 Studium der Biochemie an der Universität Hannover
Abschluss: Diplom-Biochemiker
02/2000 - 08/2000 Diplomarbeit am Institut für Pharmakologie der Medizinischen
Hochschule Hannover unter Betreuung von PD Dr. M. Kracht
06/2001 - 06/2004 Doktorarbeit am Institut für Biochemie der Universität zu Köln
unter Betreuung von Prof. Dr. R. Krämer

Stipendium

02/1998 - 08/2000 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes

Praktikum

10/2000 - 12/2000 Praktikum bei der Unternehmensberatung McKinsey & Co.

Zusatzqualifikationen, Tätigkeiten

07/1994 D-Prüfung für Organisten, Bremische Evangelische Kirche
06/1998 Fachkunde Strahlenschutz, Fachkundegruppe 4.2 nach § 6 StrSchV
09/1998 Fachkunde Biologische Sicherheit (§ 15 Abs. 2 Satz 1 Nr. 3 GenTSV)
05/2002 - 06/2004 Stellvertretender Strahlenschutzbeauftragter am Institut für Biochemie