

**Der Regulationsmechanismus  
des Osmosensors BetP  
aus *Corynebacterium glutamicum***

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

**Vera Magdalena Ott**  
aus Neuwied

Köln, Mai 2008

Diese Arbeit wurde am Institut für Biochemie der Universität zu Köln unter Anleitung von Herrn Professor Dr. R. Krämer durchgeführt.

**Berichterstatter:** Professor Dr. R. Krämer  
Professor Dr. U.- I. Flügge

**Tag der letzten mündlichen Prüfung:** 01. Juli 2008

„Ich bin immer noch verwirrt, aber auf einem höheren Niveau.“

**Enrico Fermi**, Physiker

## KURZZUSAMMENFASSUNG

Der sekundäre Glycinbetaintransporter BetP ist eines von vier osmoregulierten Transportsystemen, die in dem Gram-positiven Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum* den Import von kompatiblen Soluten unter hyperosmotischen Bedingungen vermitteln. Hierbei fungiert BetP zugleich als Osmosensor und Osmoregulator. Das heißt, BetP ist in der Lage, osmotischen Stress selbstständig zu detektieren und seine katalytische Aktivität in Abhängigkeit des detektierten Stresses zu regulieren. Messungen in Proteoliposomen hatten belegt, dass eine erhöhte interne Kaliumionenkonzentration als spezifischer Reiz zur Aktivierung von BetP fungiert. In dieser Arbeit wurde erstmalig ein *in vitro* identifizierter Stimulus für einen Osmosensor *in vivo* verifiziert. So konnte gezeigt werden, dass die BetP-Aktivierung auch in lebenden Zellen von Kalium abhängt. Jedoch wurden Indizien gefunden, dass *in vivo* neben Kalium noch ein zweiter Stimulus zur osmoabhängigen BetP-Aktivierung existiert. Es war bekannt, dass die cytoplasmatische C-terminale Extension des BetP-Proteins in die K<sup>+</sup>-abhängige Regulation des Transporters involviert ist. Durch ortsgerichtete Mutagenese innerhalb dieser putativen,  $\alpha$ -helikalen Sensordomäne wurde gezeigt, dass nicht einzelne Aminosäurereste, sondern vielmehr die korrekte Konformation oder relative räumliche Orientierung der C-terminalen Domäne für die BetP-Regulation entscheidend ist. Die Charakterisierung C-terminaler BetP-Varianten in verschiedenen Membrenumgebungen ließ den Schluss zu, dass die Konformation der  $\alpha$ -helikalen C-Domäne über Interaktionen mit negativ geladenen Membranlipiden stabilisiert wird. Diese These konnte gestützt werden, indem Interaktionen der C-Domäne mit verschiedenen Lipidoberflächen durch Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie analysiert wurden. Außerdem wurden mittels biochemischer Methoden erstmalig weitere cytoplasmatische Proteinbereiche identifiziert, die über Interaktionen mit der C-Domäne zur Detektion oder Transduktion des Kaliumsignals in den Mechanismus der BetP-Aktivierung eingebunden sind. Durch die hier gewonnenen Daten konnte ein neues Modell für den Regulationsmechanismus des Osmosensors BetP entworfen werden.

**ABSTRACT**

The secondary glycine-betaine transporter BetP is one of four osmoregulated carriers, which mediate the import of compatible solutes in the Gram-positive soil bacterium *Corynebacterium glutamicum* under hyperosmotic conditions. BetP serves both as an osmosensor and osmoregulator. Thus the protein has the ability to sense osmotic stress and to regulate its catalytic activity in dependence of the given stress situation. Investigations in proteoliposomes had shown that an elevated internal  $K^+$  concentration is the specific stimulus for BetP activation *in vitro*. In this work a stimulus for an osmosensor identified *in vitro* could be verified *in vivo* for the first time, as it was shown that BetP activity depends also in living cell on the presence of potassium. However, the *in vivo* measurements indicated that beyond  $K^+$  a second stimulus is required for osmoresponsive BetP-activation in living cells. It was known that the cytoplasmic C-terminal BetP-domain is essential for potassium sensing. Using site-directed mutagenesis here it was proven that rather the correct conformation or relative spatial orientation than single amino acid residues of this  $\alpha$ -helical domain is critical for BetP-regulation. The characterization of C-terminal mutants in different membrane surroundings revealed that the conformation of the C-domain is stabilized by interactions with negatively charged membrane lipids. This idea was corroborated by investigating C-domain interactions with lipids of various compositions in surface-plasmon-resonance spectroscopic studies. By using biochemical methods distinct cytoplasmic protein regions could be identified as interaction partners of the C-domain. These are most likely involved in the detection or transduction of the stimulating  $K^+$ -signal. The data provided by this work are combined in a new model describing the BetP regulatory mechanism.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Osmotische Eigenschaften einer Zelle .....	1
1.2	Osmolalität und Osmolarität einer Lösung.....	3
1.3	Die hypoosmotische Stressantwort .....	3
1.4	Die hyperosmotische Stressantwort.....	4
1.4.1	Kompatible Solute und das Modell des <i>preferential exclusion</i> .....	5
1.4.2	Phasen der Osmoadaptation .....	6
1.4.3	Aufnahmesysteme für kompatible Solute .....	7
1.4.4	Sensorproteine für osmotischen Stress.....	8
1.4.5	Die Osmosensoren ProP und OpuA.....	10
1.4.6	Der Glycinbetain-Transporter BetP aus <i>C. glutamicum</i> .....	12
1.5	Ziel der Arbeit .....	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>16</b>
2.1	Bakterienstämme und Plasmide .....	16
2.2	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen .....	20
2.2.1	Nährmedien für <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i> .....	20
2.2.2	Medienzusätze.....	22
2.2.3	Kultivierungsbedingungen .....	22
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	22
2.3.1	Herstellung transformationskompetenter Zellen und Transformation.....	22
2.3.2	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i> .....	23
2.3.3	Modifikation von DNA .....	24
2.3.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	24
2.3.5	Ortsgerichtete Mutagenese .....	24
2.3.6	DNA-Sequenzierung.....	25
2.4	Allgemeine analytische Methoden.....	26
2.4.1	Proteinbestimmungen.....	26
2.4.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	26
2.4.3	Immunologischer Nachweis von BetP-Varianten im Western Blot .....	27
2.4.4	Immunologischer Nachweis von rekombinanten GST-Proteinen im Western Blot .....	27
2.4.5	Bestimmung der Osmolalität.....	28
2.4.6	Bestimmung der Biotrockenmasse .....	28
2.4.7	Bestimmung der Kaliumkonzentration in Zellen und Überständen.....	28

<b>2.5</b>	<b>Biochemische Methoden</b> .....	<b>29</b>
2.5.1	Isolierung des GST-C-BetP-Fusionsproteins.....	29
2.5.2	Isolierung der BetP-C-Domäne aus dem GST-C-BetP-Fusionsprotein .....	30
2.5.3	Membranpräparationen für die Isolierung von Strep-BetP .....	30
2.5.4	Isolierung von Strep-BetP über StrepTactin-Affinitätschromatographie .....	31
2.5.5	Präparation von Liposomen .....	32
2.5.6	Rekonstitution von Strep-BetP in Liposomen .....	32
2.5.7	Variation der Lipidzusammensetzung der Liposomenmembran und Variation des internen Liposomenpuffers .....	33
2.5.8	Beladen von Proteoliposomen mit Peptiden .....	33
2.5.9	Nachweis der Orientierung von Strep-BetP in Proteoliposomen .....	34
2.5.10	<i>Peptide array</i> Experimente .....	34
2.5.11	Radiochemische Transportmessungen .....	35
<b>2.6</b>	<b>Biophysikalische Methode: <i>Surface-plasmon-resonance</i>-Spektroskopie</b> .....	<b>38</b>
2.6.1	Theoretische Grundlagen .....	38
2.6.2	Kinetische Zusammenhänge und Datenauswertung .....	40
2.6.3	Kopplung von Liposomen auf einen L1-Chip und Durchführung von Interaktionsexperimenten .....	42
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Ortsgerichtete Mutagenese der C-terminalen Domäne</b> .....	<b>44</b>
3.1.1	Immunologische Quantifizierung C-terminaler BetP-Varianten .....	47
3.1.2	Aktivitätsregulation C-terminaler BetP-Prolinvarianten in <i>E. coli</i> MKH13 Zellen .....	47
3.1.3	Aktivitätsregulation C-terminaler BetP-Varianten mit Nicht- Prolinsubstitutionen in <i>E. coli</i> MKH13 .....	50
3.1.4	Aktivitätsregulation C-terminaler BetP-Varianten im niederosmolaren Bereich.....	51
3.1.5	Aktivitätsregulation C-terminaler BetP-Varianten in <i>C. glutamicum</i> DHPF .....	53
<b>3.2</b>	<b>Regulation und Orientierung C-terminaler BetP-Varianten in Proteoliposomen</b> .....	<b>56</b>
3.2.1	Einfluss der Kopfgruppenladung umgebender Membranlipide auf die Regulation C-terminaler BetP-Varianten .....	56
3.2.2	Einfluss der Membranumgebung sowie C-terminaler Substitutionen auf die Orientierung von BetP in Proteoliposomen .....	58
<b>3.3</b>	<b>Aktivitätsregulation N-terminal deletierter BetP-Varianten</b> .....	<b>60</b>
<b>3.4</b>	<b>Interaktionsstudien</b> .....	<b>63</b>

3.4.1	Intramolekulare Interaktionen der C-terminalen Domäne .....	63
3.4.2	Interaktionen der BetP-Extensionen mit Lipidoberflächen .....	68
<b>3.5</b>	<b>Untersuchung des Kaliumstimulus in lebenden Zellen.....</b>	<b>72</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>82</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>105</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>107</b>
6.1	Topologiemodell für BetP.....	107
6.2	Sequenzen zu <i>peptide arrays</i> .....	108
6.3	Sekundärstrukturvorhersagen für C-terminale BetP-Varianten .....	110
6.4	<i>Helical wheel</i> Vorhersage für die C-terminale Domäne .....	112
<b>7</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>113</b>



## Abkürzungsverzeichnis

AHT	Anhydrotetracyclin
Amp <sup>R</sup>	Resistenz gegen Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
BCCT-Familie	Betain-Cholin-Carnitin-Transporter-Familie
BCIP/NBT	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-Phosphat/Nitro-Blau-Tetrazolium
BHI-Medium	Brain-Heart-Infusion-Medium
BSA	Rinderserumalbumin
BTM	Biotrockenmasse
CL	Cardiolipin
Cm <sup>R</sup>	Resistenz gegen Chloramphenicol
DDM	Dodecylmaltosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-Glycerol-3-Phosphocholin
DOPE	1,2-Dioleoyl-sn-Glycerol-3-Phosphoethanolamin
DOPG	1,2-Dioleoyl-sn-Glycerol-3-Phosphat
DOPS	1,2-Dioleoyl-sn-Glycerol-3-Phosphoserin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GST	Glutathione-S-Transferase
Fmoc	Fluorenyl-Methoxy-Carbonyl
h	Stunden
HABA	4-Hydroxy-Azobenzol-2-Carboxylsäure
IPTG	Isopropylthiogalactosid
HRP	<i>horseradish</i> -Phosphatase
kDa	Kilo-Dalton
$k_{kat}$	Wechselzahl
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
$K_d$	Dissoziationskonstante
KP <sub>i</sub>	Kalium-Phosphat-Puffer
LB-Medium	Luria Bertani-Medium

## Abkürzungsverzeichnis

---

LPR	Lipid-Protein-Verhältnis
MFS	<i>major faciliator superfamily</i>
NaP <sub>i</sub>	Natrium-Phosphat-Puffer
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
Pipes	Piperazin-1,4-Bis-2-Ethansulfon-Säure
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPR	<i>surface-plasmon-resonance</i>
SSS	<i>sodium/solute-symporter</i>
Trap	<i>tripartite ATP-independent periplasmic</i>
TRIS	2-Amino-Hydroxymethylpropane-1,3-Diol
ÜN-Kultur	Übernacht-Kultur
Upm	Umdrehungen pro Minute
V <sub>max</sub>	Maximalgeschwindigkeit

# 1 Einleitung

Fluktuationen in der externen Osmolarität gehören zu den häufigsten Stresssituationen mit denen Bakterien sowohl in ihren natürlichen Habitaten als auch unter Laborbedingungen konfrontiert werden. Mechanismen zur effektiven Homöostase des Zellvolumens sind für alle Zellen unabdingbar, um unter Extremsituationen die Integrität der Zelle zu bewahren und Stoffwechsel und Wachstum unabhängig von den externen Gegebenheiten aufrechtzuerhalten. Diese Arbeit behandelt einen spezifischen Teil der Anpassung des Modellorganismus *Corynebacterium glutamicum* an osmotischen Stress und trägt somit zum Verständnis eines grundlegenden biologischen Phänomens bei.

Das Gram-positive Bodenbakterium *C. glutamicum* wurde 1957 von Kinoshita *et al.* als Glutamat-produzierender Organismus isoliert und charakterisiert. Phylogenetisch wird das aerobe, nicht-mobile und nicht-sporulierende Bakterium den GC-reichen Actinomyceten zugeordnet (Abe *et al.*, 1967). In der Unterordnung der *Corynebacterineae* gehört es hier zur Familie der *Corynebacteriaceae* (coryneforme = keulenförmige Bakterien) (Liebl, 2005). Seine Bedeutung als Modellorganismus liegt in seiner engen Verwandtschaft mit den humanpathogenen Bakterien *C. diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis* und *M. leprae* begründet. Zudem hat *C. glutamicum* seit mehreren Jahrzehnten weltweite Bedeutung für die fermentative Produktion von L-Glutamat und L-Lysin im industriellen Maßstab erlangt (Leuchtenberger *et al.*, 2005). Da der Organismus während des Fermentationsprozesses hohen externen Osmolaritäten ausgesetzt ist, ist das Verständnis der Osmostressantwort in *C. glutamicum* also auch von biotechnologischem Interesse (Krämer, 1994).

## 1.1 Osmotische Eigenschaften einer Zelle

Der Effekt von Änderungen der umgebenden Osmolarität auf Zellen beruht auf der selektiven Permeabilität einer biologischen Membran, welche das cytoplasmatische Kompartiment einer Bakterienzelle von ihrer Umgebung abgrenzt. Die Cytoplasmamembran ist impermeabel für Makromoleküle, Ionen und polare Substanzen, während Wasser frei durch die Lipiddoppelschicht diffundieren kann. Steigt oder fällt die Osmolarität des externen Mediums, so entsteht über die Membran ein Gradient des chemischen Wasserpotentials und Wasser diffundiert entlang des Potentialgradienten in das Kompartiment geringeren Potentials. Diese gerichtete Diffusion wird als Osmose

bezeichnet. Die Diffusion des Wassers über die Membran kann zusätzlich durch Aquaporine beschleunigt werden. Diese Wasser-selektiven Kanäle sind weit verbreitet und kommen in Archaeen, Bakterien und Eukaryoten vor. Ihre physiologische Relevanz für Bakterien ist aber noch immer umstritten (Calamita *et al.*, 1995; Kruse *et al.*, 2006; Tanghe *et al.*, 2006). In *C. glutamicum* wurden keine Aquaporine gefunden.

Das chemische Potential des Wassers ( $\Psi_W$ ), auch Wasseraktivität genannt, setzt sich zusammen aus dem osmotischen Potential ( $\Psi_\pi$ ) und dem hydrostatischen Druck einer Lösung ( $\Psi_p$ ):

$$\Psi_W = \Psi_\pi + \Psi_p \quad \text{(Gleichung 1.1)}$$

$\Psi_\pi$  beschreibt hierbei den Einfluss gelöster Stoffe auf das Wasserpotential und  $\Psi_p$  ist der Turgordruck, den die Plasmamembran auf die Zellwand ausübt. Das osmotische Potential  $\Psi_\pi$  einer wässrigen Lösung ist proportional zur Konzentration der gelösten Substanzen  $c_s$ . Nach der Van't Hoff'schen Gleichung gilt:

$$\Psi_\pi = -RT c_s \quad \text{(Gleichung 1.2)}$$

(R = allgemeine Gaskonstante, T: absolute Temperatur)

Die Konzentration osmotisch aktiver Substanzen in der Zelle ist normalerweise deutlich höher - das heißt  $\Psi_\pi$  ist negativer - als im Medium. Der hieraus resultierende Wasserseinstrom führt zum Aufbau eines positiven Turgordrucks  $\Psi_p$  gegen die Zellwand, der so weit ansteigt, bis der negative Potentialgradient ausgeglichen ist (Cosgrove, 2000). In Gram-negativen Bakterien beträgt der Turgordruck 1 bis 5 atm, in Gram-positiven Bakterien 15 bis 25 atm (Poolman und Glaasker, 1998). Schwankungen in der externen Osmolarität (s. u.) induzieren also nach Gleichung 1.1 ein Absinken (hyperosmotischer Stress) oder einen Anstieg (hyposmotischer Stress) des Zellturgors. Osmoregulation bedeutet, dass die intrazelluläre Solutkonzentration (beziehungsweise das osmotische Potential  $\Psi_\pi$ ) an die externen Bedingungen angepasst und somit Turgorveränderungen nivelliert werden. Die strikte Regulation des Turgors ist für die Bakterienzelle lebensnotwendig, da er die mechanische Kraft für die Ausdehnung der Zellwand und somit die Voraussetzung für Zellwachstum ist (Koch, 1983).

## 1.2 Osmolalität und Osmolarität einer Lösung

Der Zusammenhang zwischen dem osmotischen Potential (osmotischen Druck) einer wässrigen Lösung und der Wasseraktivität kann auch wie folgt ausgedrückt werden:

$$\Psi_{\pi} = -(RT/V_w) \ln \Psi_w \quad \text{(Gleichung 1.3)}$$

( $V_w$ = partielles molares Volumen des Wassers)

Hiervon lässt sich die Osmolalität (in osmol/kg) einer Lösung ableiten:

$$\text{Osmolalität} = \Psi_{\pi} / RT \quad \text{(Gleichung 1.4)}$$

Die Osmolalität kann gemessen, jedoch nicht berechnet werden, da der Einfluss, den ein Teilchen auf die Wasseraktivität ausübt, von Ladung, Größe oder Form des Teilchens abhängig ist. Eine rechnerische Annäherung stellt jedoch die Osmolarität dar, welche berechnet aber nicht gemessen werden kann und die Zahl osmotisch wirksamer Teilchen in mol/l (oder osM) angibt (Wood, 1999):

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

## 1.3 Die hypoosmotische Stressantwort

Hypoosmotischer Stress entsteht, wenn die Osmolarität des externen Mediums stark herabgesetzt, die Wasseraktivität also erhöht wird. Nach den Gesetzen der Osmose strömt dann Wasser in die Zelle ein, die Zelle schwillt an und der Turgordruck steigt. Um das Platzen der Zelle zu verhindern, werden Ionen und kleine Solute ins Medium entlassen. Hierdurch steigt das osmotische Potential in der Zelle, das Wasser fließt zurück und der Turgor wird normalisiert. Der schnelle Efflux von Ionen und Soluten wird durch mechanosensitive Kanäle vermittelt (Berrier *et al.*, 1992; Ruffert *et al.*, 1999; Wood, 1999). Diese ubiquitär verbreiteten Membranproteine detektieren über direkte Interaktionen mit der Lipiddoppelschicht eine erhöhte laterale Membranspannung, welche ihren Öffnungsmechanismus auslöst (Sukharev *et al.*, 2001; Booth *et al.*, 2007). In *Escherichia coli* wurden drei Gruppen mechanosensitiver Kanäle gefunden: MscS, MscL und MscM. Die Nomenklatur beruht auf ihren unterschiedlichen Leitfähigkeiten

(*mechanosensitive channel of large, small, mini conductance*). Je größer die Leitfähigkeit eines Kanals ist, desto höher liegt auch seine Aktivierungsschwelle. So können die mechanosensitiven Kanäle trotz geringer Substratspezifität eine, der Stärke des osmotischen Schocks angepasste, graduelle Stressantwort vermitteln (Berrier *et al.*, 1996; Csonka und Epstein, 1996). Die beiden sehr gut charakterisierten Kanäle MscS und MscL, werden codiert durch die Gene *mscL* und *yggB*. MscM konnte hingegen noch nicht genetisch identifiziert werden (Sukharev *et al.*, 1994, 2001; Levina *et al.*, 1999; Bass *et al.*, 2002; Booth *et al.*, 2007). In *C. glutamicum* sind bisher zwei mechanosensitive Kanäle bekannt: MscL und YggB (Ruffert *et al.*, 1997, 1999). Die Existenz mindestens eines weiteren Kanals wird jedoch durch die Beobachtung impliziert, dass nach Ausschaltung der Gene *mscL* und *yggB*, noch schneller Betainefflux detektiert werden konnte (Nottebrock *et al.*, 2003; Kirsten Börngen, persönliche Mitteilung).

### 1.4 Die hyperosmotische Stressantwort

Ein hyperosmotischer Schock induziert osmotischen Wasserausstrom aus der Zelle. Durch das Zusammenbrechen des Turgors und die Dehydrierung des Cytoplasmas werden Wachstum und Zellmetabolismus gefährdet (Wood, 1999). Bakterien überwinden diese lebensbedrohliche Stresssituation, indem die Konzentration osmotisch wirksamer Teilchen im Cytoplasma erhöht und somit der Wasserverlust gestoppt wird. Hier können prinzipiell zwei Strategien unterschieden werden: 1) Bei der *salt-in*-Strategie werden anorganische Ionen, vorwiegend  $K^+$  und  $Cl^-$ , in hohen Konzentrationen (bis zu 7 M) im Cytoplasma akkumuliert. Diese Form der Osmoadaptation wird von einigen halophilen Bakterien und Archaeen angewandt. Sie erfordert eine weitreichende Anpassung der zellulären Maschinerie an die hohen cytoplasmatischen Ionenstärken und ermöglicht die Besiedelung hochsaliner Habitats, schränkt aber gleichzeitig den Lebensraum auch auf diese speziellen Habitats ein (Galinski und Trüper, 1994). 2) Die meisten Bakterien verfolgen die *salt-out* Strategie, bei der nicht anorganische Ionen, sondern kleine organische Substanzen, so genannte kompatible Solute, im Cytoplasma akkumuliert werden. Diese Organismen können zwar nur gemäßigt salzhaltige Habitats besiedeln, zeigen jedoch hohe Flexibilität bei der Bewältigung stark fluktuierender externer Osmolaritäten (Sleator und Hill, 2001; Pflüger und Müller, 2004).

### 1.4.1 Kompatible Solute und das Modell des *preferential exclusion*

Kompatible Solute sind definiert als niedermolekulare Substanzen, die in sehr hohen Konzentrationen im Cytoplasma akkumuliert werden können, ohne dabei die Physiologie der Zelle zu stören. Sie können gemäß ihrer Molekülstruktur in verschiedene Klassen unterteilt werden: Aminosäuren, Aminosäurederivate, kleine Peptide, Methylamine, Sulfatester, Polyole und Zucker. Die einzelnen Bakterienspezies verwenden unterschiedliche Spektren kompatibler Solute, am meisten verbreitet sind jedoch Glycinbetain, Prolin, Ectoin und Trehalose (Abbildung 1.1) (Bremer und Krämer, 2000). Kompatible Solute tragen auf zwei Arten zum Schutz gegen hyperosmotischen Stress bei, zum einen durch ihre osmotische Wirksamkeit, zum anderen durch ihre Eigenschaft, die native Struktur von Proteinen zu stabilisieren. Kompatible Solute sind *kosmotrop*. Dies bedeutet, dass sie, im Gegensatz zu *chaotropen* Molekülen (wie zum Beispiel Harnstoff), nicht mit dem Lösungsmittel Wasser interagieren und so die Wasserstruktur verstärken. Die Interaktion des Wassers mit der Proteinoberfläche wird hierdurch verbessert und die kompatibeln Solute bleiben von der Hydrathülle ausgeschlossen. Durch diesen Effekt des *preferential exclusion* sind auch hohe Konzentrationen dieser Substanzen nicht schädlich für den Zellmetabolismus (Arakawa und Timasheff, 1985; Yancey, 1982; Wood, 1999).

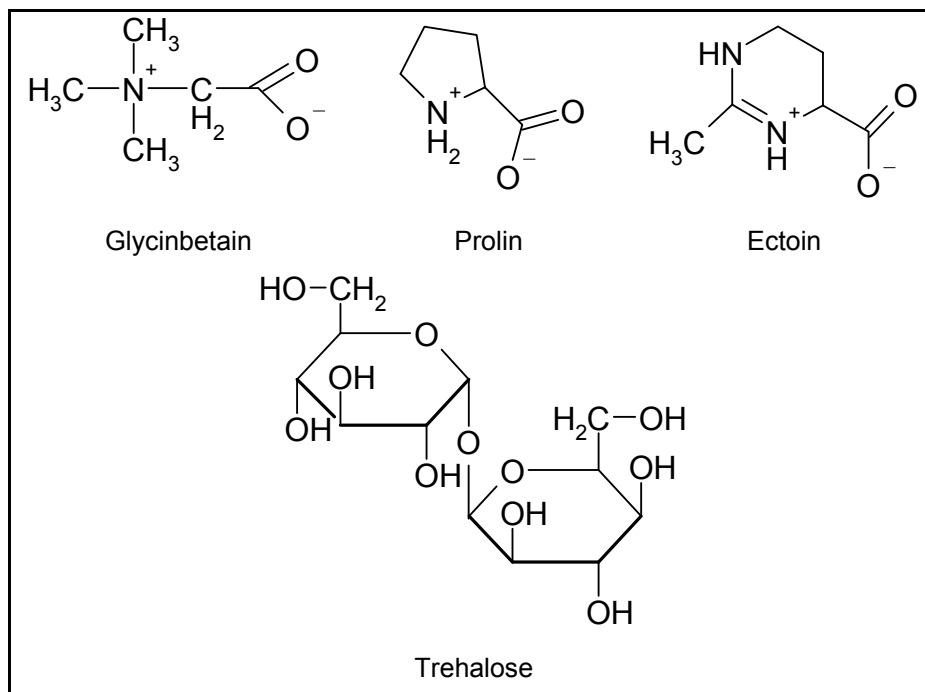


Abbildung 1.1: Die wichtigsten kompatiblen Solute für Bakterien.

### 1.4.2 Phasen der Osmoadaptation

Die Antwort einer Bakterienzelle auf einen hyperosmotischen Schock kann in zwei Phasen unterteilt werden: 1) Die schnelle Aufnahme von Kaliumionen. 2) Die langfristige Akkumulation großer Mengen kompatibler Solute. Osmotisch induzierter  $K^+$ -Import ist sowohl für das Gram-negative Bakterium *E. coli*, als auch für das Gram-positive Bakterium *Bacillus subtilis* beschrieben worden (Epstein, 1986; Whatmore *et al.*, 1990). In *E. coli* wird dieser vorwiegend über ein niederaffines Trk-System und ein hochaffines Kdp-System, in *B. subtilis* über ein Ktr-System vermittelt (Epstein, 2003; Holtmann *et al.*, 2003). Der entstehende Überschuss an positiven Ladungen wird in *E. coli* durch die Synthese von Glutamat teilweise kompensiert (Dinnbier *et al.*, 1988; McLaggan *et al.*, 1994). Wie ein vollständiger Ladungsausgleich erreicht wird, ist aber bis heute unverstanden. In *C. glutamicum* wurden kürzlich zwei Kaliumaufnahmesysteme identifiziert. Ein Kup-System mit Ähnlichkeit zum Kationen/Protonen-Symporter Kup aus *E. coli* und ein Kaliumkanal (*cgIK*) mit starker Ähnlichkeit zu *mthK* aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Becker, 2007). Die beiden Systeme sind jedoch biochemisch noch nicht charakterisiert und es gibt keinen Nachweis für eine spezifische Aktivierung der  $K^+$ -Aufnahme unter hyperosmotischen Bedingungen. Ebenso ist die Rolle der Glutamatsynthese in dieser Phase nicht eindeutig geklärt (Morbach und Krämer, 2003).

Nachdem durch die erste Phase der bakteriellen Osmoadaptation die Dehydrierung der Zelle schnell gestoppt wurde, wird in der zweiten Phase Kalium durch neutrale kompatible Solute ersetzt, um schädliche Effekte durch hohe Ionenkonzentrationen zu vermeiden. Zur Langzeitadaptation wird von *E. coli* vorwiegend Trehalose synthetisiert (Dinnbier *et al.*, 1988). *C. glutamicum* bevorzugt hier unter guter Stickstoffversorgung die Synthese von Prolin, ist aber auch zur Synthese von Trehalose, Glutamat und Glutamin befähigt (Ley, 2001; Wolf *et al.*, 2003; Rönsch *et al.*, 2003). Sind kompatible Solute im Medium verfügbar, so bevorzugen alle Bakterien deren Import gegenüber der *de novo* Synthese, da dieser schneller und energetisch günstiger für die Zelle ist. Hierzu sind Bakterien mit verschiedenen Transportsystemen ausgestattet (siehe Kapitel 1.4.3). Sowohl die Biosynthese als auch der Import kompatibler Solute werden nicht nur auf Aktivitätsebene, sondern auch auf Ebene der Genexpression osmoabhängig reguliert (Jovanovich, *et al.*, 1988; Culham *et al.*, 1993; Peter *et al.*, 1998b; Ley, 2001; Wolf *et al.*, 2003; Möker *et al.*, 2004). Die Anpassung der Genexpression an die hyperosmotische Stresssituation stellt den letzten Schritt der Langzeitosmoadaptation dar.



### 1.4.3 Aufnahmesysteme für kompatible Solute

Osmoregulierte Aufnahmesysteme für kompatible Solute sind in diversen Transporterfamilien vertreten (Tabelle 1.1). So sind sowohl primäre ABC-(**ATP-binding cassette**)-Transporter wie OpuA aus *Lactobacillus lactis* oder ProU aus *E. coli* (Obis *et al.*, 1999; Lucht und Bremer, 1994) als auch sekundär aktive Transporter der Familien MFS (**major faciliator superfamily**), SSS (**sodium/solute symporter**) und BCCT (**Betain/Carnitin/Cholin-Transporter**) als bakterielle, osmoregulierte Carrier bekannt (Saier, 2000; Morbach und Krämer; 2004). Zuletzt wurde auch ein Mitglied der Trap-(**tripartite ATP-independent periplasmic**)-Transporterfamilie (TeaABC aus *Halomonas elongata*) als osmoreguliertes Aufnahmesystem identifiziert (Gramman *et al.*, 2002). Die Tatsache, dass strukturell und transportmechanistisch sehr unterschiedliche Proteine osmotisch reguliert sind, spricht dafür, dass sich die Mechanismen zur Detektion von osmotischem Stress mehrfach unabhängig voneinander entwickelt haben.

**Tabelle 1.1: Wichtige osmoregulierte bakterielle Transporter.** (nach Gramman *et al.*, 2002; Morbach und Krämer, 2004); ABC= *ATP-binding cassette*; MFS= *major faciliator superfamily*; BCCT= *Betain/Carnitin/Cholin-Transporter*; SSS= *sodium/solute-symporter*; TrapT= *tripartite-ATP-independent periplasmic-Transporter*.

Familie		Transporter	Organismus	Hauptsubstrat
<b>ABC</b>	primär	OpuA	<i>L. lactis</i>	Betain
		OpuA	<i>B. subtilis</i>	Betain
		OpuC	<i>B. subtilis</i>	Betain
		OpuB	<i>B. subtilis</i>	Cholin
		ProU	<i>E. coli</i>	Betain
<b>MFS</b>	sekundär	ProP	<i>E. coli</i>	Prolin
<b>BCCT</b>	sekundär	BetT	<i>E. coli</i>	Betain
		OpuD	<i>B. subtilis</i>	Betain
<b>SSS</b>	sekundär	OpuE	<i>B. subtilis</i>	Prolin
<b>TrapT</b>	sekundär	TeaABC	<i>H. elongata</i>	Ectoin

*C. glutamicum* besitzt vier sekundär aktive, osmoregulierte Aufnahmesysteme für kompatible Solute: BetP, EctP, LcoP, ProP, die den Familien BCCT und MFS angehören und sich bezüglich ihrer Substratspezifität sowie des verwendeten Co-Substrates unterscheiden (Tabelle 1.2) (Peter *et al.* 1998b; Kappes *et al.*, 1996; Saier *et al.*, 1999; Saier, 2000). *BetP*, *lcoP* und *proP* werden auch auf der Ebene der Transkription reguliert. Sie stehen unter der Kontrolle des Zweikomponentensystems MtrBA, welches ihre

Expression nach einem hyperosmotischen Schock induziert. *EctP* hingegen wird konstitutiv exprimiert (Weinand *et al.*, 2007).

**Tabelle 1.2: Osmoregulierte Aufnahmesysteme für kompatible Solute in *C. glutamicum*.** (Peter *et al.*, 1996, 1997, 1998b; Steger, 2002). MFS= *major faciliator superfamily*; BCCT= Betain/Carnitin/Cholin-Transporter.

Transporter	Familie	Co-Substrat	Substrate	$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$V_{max}$ [nmol/min*mg TG]
BetP	BCCT	Na <sup>+</sup>	Betain	8,6	110
EctP	BCCT	Na <sup>+</sup>	Ectoin	63	27
			Betain	333	34
			Prolin	1200	34
LcoP	BCCT	Na <sup>+</sup>	Betain	154	8,5
			Ectoin	539	8,6
ProP	MFS	H <sup>+</sup>	Prolin	48	71
			Ectoin	132	129

#### 1.4.4 Sensorproteine für osmotischen Stress

Die unmittelbare Detektion von osmotischem Stress ist eine Voraussetzung für eine schnelle Stressantwort. Hierfür besitzen Bakterien so genannte Osmosensoren, welche definiert sind als Proteine, die Änderungen der Wasseraktivität (direktes Osmo-sensing) oder hieraus resultierende Veränderungen in der Zellstruktur oder -komposition (indirektes Osmo-sensing) detektieren und eine osmoregulatorische Antwort auslösen (Wood, 2007). Bei allen bislang bekannten Osmosensoren handelt es sich um integrale Membranproteine, die unterteilt werden können in die Gruppe von Transportern und Kanälen sowie die Zweikomponentensysteme (ZKS). Während die erste Gruppe für die direkte Stressantwort auf Ebene der Proteinaktivität verantwortlich ist, das heißt für die Aufnahme und Abgabe von kompatiblen Soluten, lösen Zweikomponentensysteme die zelluläre Stressantwort auf Ebene der Genexpression aus. Hierbei wird der Stress durch eine membranständige Sensorhistidinkinase detektiert. Diese überträgt nach einer Autophosphorylierung den Phosphatrest auf einen cytoplasmatischen Antwortregulator, welcher dann direkt oder indirekt die Expression von Zielgenen induziert oder reprimiert (Möker *et al.*, 2007a). ZKS sind also eher für die Langzeitadaptation an osmotischen Stress von Bedeutung.

Interessanterweise wird die katalytische Aktivität anderer Proteine, wie zum Beispiel die der Lactose-Permease LacY, unter Osmostressbedingungen eingeschränkt, während ein Osmosensor erst unter diesen Bedingungen aktiviert wird (Wood, 2006). Die Aktivierung von Proteinen unter Bedingungen, die für andere Transporter eher inhibierend sind, macht die Frage nach dem aktivierenden Reiz eines Osmosensors und das Verständnis seines Aktivierungsmechanismus besonders spannend. Sowohl unter hyper- als auch unter hypoosmotischen Bedingungen führen die Wasserflüsse aus oder in die Zelle zur zeitgleichen Modifikation verschiedener Parameter, welche als mögliche Reize für Osmosensoren in Frage kommen (Wood, 1999; Morbach und Krämer, 2004). Dies sind die Veränderung des Zellurgors oder hieraus resultierende Veränderungen der Membranspannung, der osmotische Gradient über die Membran, die Änderung des osmotischen Potentials *per se* beziehungsweise die interne oder externe Ionenstärke sowie Konzentrationsveränderungen einzelner Solute oder Ionen (Wood, 1999). Im Falle des hyperosmotischen Stresses kommt außerdem *macromolecular crowding* in Frage. Hierbei handelt es sich um die Neigung von Makromolekülen durch ihren Platzbedarf in einer Lösung, biochemische Gleichgewichte (zum Beispiel Proteinfaltung) oder Reaktionen (zum Beispiel Enzymaktivitäten) zu beeinflussen (Wood, 2007). Zwar sind die unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Makromolekülen an sich schwach, jedoch nehmen Makromoleküle etwa 50% des Zellvolumens ein und dieser Anteil wird durch osmotisches Schrumpfen der Zelle noch weiter erhöht. So kann die extrem dichte Packung von Makromolekülen durchaus einen Effekt auf Osmosensoren ausüben (Garner und Burg, 1994).

Die funktionale Rekonstitution von Osmosensoren in artifiziellen Proteoliposomen ist seit langem die Methode der Wahl für die Charakterisierung ihrer sensorischen Eigenschaften. Zum einen kann in dem isolierten System überprüft werden, ob sensorische, regulatorische und katalytische Eigenschaften in einem Protein vereint sind, zum anderen ermöglicht es die Identifizierung beziehungsweise Eingrenzung des aktivierenden Reizes für einen Osmosensor, da verschiedene potentielle Stimuli systematisch und unabhängig voneinander variiert werden können. Allerdings ist das methodische Potential des Proteoliposomensystems insofern begrenzt, als dass Faktoren wie Turgor, die mechanische Beschaffenheit der Cytoplasmamembran oder *macromolecular crowding* nicht oder nur bedingt erfasst werden können. Dennoch konnten durch das artifizielle System in der Vergangenheit für eine Reihe von Osmosensoren die aktivierenden Reize eingegrenzt beziehungsweise identifiziert werden. Tabelle 1.3 gibt einen Überblick über bekannte Osmosensoren und die von ihnen detektierten Stimuli.

**Tabelle 1.3: Osmosensoren und die von ihnen detektieren Stimuli.**

(nach Wood, 2007; Jung *et al.*, 2001; Sukharev *et al.*, 2002; Schiller *et al.*, 2004a; Wood, 2006; Mahmood *et al.*, 2006; Möker *et al.*, 2007a, b; Jeon und Voth, 2008; Hamann *et al.*, 2008)

Sensor	Funktion	Organismus	perzipierter oder ausge-schlossener Stimulus	direktes Sensing?
MscL	mechanosensitiver Kanal	<i>M. tuberculosis</i>	Membranspannung	nein
MscS	mechanosensitiver Kanal	<i>E. coli</i>	Membranspannung/ elektrisches Potential	nein
ProP	H <sup>+</sup> /Prolin-Symporter	<i>E. coli</i>	Hydratationsstatus	ja
BetP	Na <sup>+</sup> /Betain-Symporter	<i>C. glutamicum</i>	interne K <sup>+</sup> -Konzentration	nein
OpuA	ABC-Transporter für Betain	<i>L. lactis</i>	interne Ionenstärke	nein
MtrB	Histidinkinase/ ZKS MtrBA	<i>C. glutamicum</i>	Hydratationsstatus	ja
KdpD	Histidinkinase/ ZKS KdpDE	<i>E. coli</i>	nicht K <sup>+</sup> /Solute intern; nicht Turgor	?
EnvZ	Histidinkinase/ ZKS EnvZ/OmpR	<i>E. coli</i>	K <sup>+</sup> ?/ nicht eindeutig geklärt	?

### 1.4.5 Die Osmosensoren ProP und OpuA

Bislang sind drei Transporter für kompatible Solute identifiziert, die zugleich als Osmosensor und Osmoregulator fungieren. Mit Hilfe von Proteoliposomen wurde gezeigt, dass sie keinen weiteren Proteinfaktor für ihre Regulation benötigen. Diese sind ProP aus *Escherichia coli*, OpuA (BusA) aus *Lactococcus lactis* und BetP aus *C. glutamicum*, der Gegenstand dieser Arbeit ist (Racher *et al.*, 1999; Rübenhagen *et al.*, 2000; van der Heide und Poolman, 2000). Die Vereinigung der drei funktionalen Ebenen Osmo-sensing, Regulation und katalytische Aktivität in einem Protein liefert einen schnellen und effektiven osmoregulatorischen Mechanismus, dessen Aufklärung im Focus der aktuellen Forschung auf dem Gebiet der Osmoregulation liegt.

ProP vermittelt in *E. coli* die Aufnahme von Soluten wie Prolin und Glycinbetain im Symport mit H<sup>+</sup>-Ionen. Der Transporter gehört zur MFS-Familie und umfasst zwölf Transmembrandomänen sowie eine cytoplasmatisch gelegene, 60 Aminosäurereste lange,  $\alpha$ -helikale Extension. Die C-terminale Extension von ProP homodimerisiert über die Ausbildung eines anti-parallelen *coiled-coil* Motives (Hillar *et al.*, 2005). Eine Destabilisierung des Dimerisierungsmotives führt zu einer verminderten Aktivierungsschwelle des Transporters, woraus die Beteiligung der C-Extension in den Regulationsmechanismus postuliert wurde. Des Weiteren wird die ProP-Aktivierungsschwelle von der Zusammensetzung der Membranumgebung beeinflusst (Tsatskis *et al.*, 2005; Romantsov *et al.*, 2008). Aus der Beobachtung, dass ProP sowohl durch verschiedene Ionen, als auch durch kleine organische Solute und Polyethylenglycole aktiviert wird, welche zur Imitation von *macromolecular crowding* Effekten verwendet werden, wurde geschlossen, dass ProP über seinen veränderten Hydratationszustand bei hyperosmotischem Stress aktiviert wird (Racher *et al.*, 2001; Culham *et al.*, 2003; Wood, 2006). Allerdings erlangt ProP nur in Gegenwart eines weiteren cytoplasmatischen Proteins, ProQ, seine volle Aktivität. Das osmoregulatorische Verhalten *per se* wird aber nicht durch ProQ verändert (Kunte *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2004).

OpuA ist ein Bindeproteinabhängiger-ABC-Transporter, der aus zwei transmembranen Translokationsdomänen (OpuAA), an welche jeweils eine periplasmatische Substratbindedomäne fusioniert ist, und zwei cytoplasmatischen ATPase Untereinheiten (OpuABC) besteht (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006a). Der Transporter wird durch eine erhöhte interne Ionenstärke aktiviert, wobei die Schwelle zur Aktivierung vom Anteil der negativ geladenen Lipide in der Membran abhängt (van der Heide *et al.*, 2001). Die OpuABC Untereinheit des Transporters besitzt C-terminal eine tandem CBS (Cystathionin- $\beta$ -Synthase)-Domäne mit einem anionischen Fortsatz. Es wurde beobachtet, dass die komplette Deletion der C-terminalen Domäne von OpuABC einen Verlust der Osmoregulation auslöste, während die Entfernung des anionischen Fortsatzes nur zu einer lipidabhängigen Modulation der Aktivierungsschwelle von OpuA führte. Auf Grund dessen wird spekuliert, dass die C-terminale Domäne von OpuABC die cytoplasmatische Ionenstärke über Interaktionen mit negativ geladenen Membranlipiden detektiert und so die Regulation von OpuA steuert (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006b; Mahmood *et al.*, 2006).

### 1.4.6 Der Glycinbetain-Transporter BetP aus *C. glutamicum*

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Osmosensor und Osmoregulator BetP (Betain-Permease) aus *C. glutamicum*, der zur **Betain/Carnitin/Cholin-Transporter-Familie** (BCCT) gehört und ausschließlich Glycinbetain im Symport mit zwei Natriumionen transportiert (Peter *et al.*, 1996; Farwick *et al.*, 1995; Rübenhagen *et al.*, 2000). Das 595 Aminosäuren umfassende BetP Monomer hat ein apparentes Molekulargewicht von 64,2 kDa und besteht laut Topologiemodell aus zwölf Transmembrandomänen sowie zwei cytoplasmatisch gelegenen Extensionen am N- beziehungsweise C-Terminus (s. Anhang 6.1, Topologiemodell). Diese Orientierung des Transporters in der Membran wurde auch experimentell nachgewiesen (Peter *et al.*, 1996; Rübenhagen *et al.*, 2001). In der achten Transmembranhelix und der darauf folgenden cytoplasmatischen Schleife besitzt BetP einige innerhalb der BCCT-Familie hoch konservierte Aminosäurereste, für die eine Beteiligung am Substrattransport angenommen wird (Peter *et al.*, 1996; Kappes *et al.*, 1996). Durch cryoelektronenmikroskopische Studien mit 2D-Kristallen konnte gezeigt werden, dass BetP in der Membran als Homotrimer vorliegt, wobei die Elektronendichten darauf schließen lassen, dass jede Untereinheit einen eigenen Translokationskanal ausbildet (Ziegler *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2007). Kinetisch zeichnet sich BetP durch eine hohe Affinität ( $K_m$ -Wert: 8,6  $\mu\text{M}$ ) zu seinem einzigen Substrat Glycinbetain (nachfolgend als Betain bezeichnet) sowie durch eine hohe Transportgeschwindigkeit mit einem  $V_{\text{max}}$  von 110 nmol/min\*mg BTM aus, womit BetP eines der schnellsten Aufnahmesysteme in *C. glutamicum* ist. BetP kann sein Substrat bis zu einem Konzentrationsgradienten von  $4 \times 10^6$  (intern:extern) akkumulieren und somit effektiv zum Schutz gegen hyperosmotischen Stress in *C. glutamicum* beitragen (Farwick *et al.*, 1995). Der  $K_m$ -Wert für das Cosubstrat  $\text{Na}^+$ , über dessen elektrochemisches Potential die Energie für den Betain Transport generiert wird, liegt bei 49,7  $\mu\text{M}$  (Ott, 2005). Die BetP-Aktivität wird in Abhängigkeit der externen Osmolalität genau reguliert. Steigt die Osmolalität im Medium über einen Wert von etwa 0,3 osmol/kg an, so geht BetP in weniger als einer Sekunde in seinen aktiven Zustand über (Peter *et al.*, 1998b). Die maximale BetP-Aktivität wird bei etwa 1,2 osmol/kg erreicht (Peter *et al.*, 1996). Eine sinnvolle und effiziente Osmostressantwort fordert auch die Inaktivierung eines Osmosensors, wenn ausreichend viele kompatible Solute zur Kompensation des Stresses akkumuliert sind. Eine solche Reduktion der BetP-Aktivität wird als *activity adaptation* bezeichnet, wobei der Zeitpunkt zu dem diese eintritt von der Stärke des applizierten Osmoschocks abhängt. Der Mechanismus der *activity adaptation* ist nicht genau verstanden, klar ist jedoch, dass dieser sich grundlegend vom Aktivierungsmechanismus unterscheidet (Botzenhardt, 2004; Morbach und Krämer, 2005). Um den

Aktivierungsmechanismus eines Osmosensors im Detail zu verstehen, müssen drei Sachverhalte geklärt werden: 1) Welcher Stimulus wird genau detektiert? 2) Welcher Proteinbereich detektiert den Stimulus? 3) Wie wird das aktivierende Signal an die katalytische Einheit des Proteins transduziert? Durch Studien mit BetP-Proteoliposomen aus *E. coli* Lipiden konnten die Membranspannung, interne/externe Osmolarität und Solutkonzentrationen als potentielle Stimuli für BetP ausgeschlossen werden. Es konnte gezeigt werden, dass BetP spezifisch durch eine Erhöhung der intraliposomalen  $K^+$ -Ionenkonzentration aktiviert wird.  $Rb^+$  und  $Cs^+$ , die einen ähnlichen Ionenradius wie  $K^+$  besitzen ( $K^+$ : 138 pm,  $Rb^+$ : 152 pm,  $Cs^+$ : 167 pm; Mortimer, 1996) wirkten ebenfalls stimulierend. Natrium löste nur eine marginale, Cholin und Ammonium lösten keine Aktivierung aus. Bei BetP handelt es sich demnach um einen indirekten Osmosensor, genauer gesagt, um einen Chemosensor (Rübenhagen *et al.*, 2001; Schiller *et al.*, 2004a; Wood, 2007). Die Aktivierungsschwelle von BetP wird durch die Kopfgruppenzusammensetzung der umgebenden Membran beeinflusst. So wurde beobachtet, dass in Proteoliposomen mit steigendem Anteil an negativ geladenem Phospholipid DOPG auch die zur Stimulierung benötigte externe Osmolalität beziehungsweise die interne  $K^+$ -Konzentration ansteigt (Schiller *et al.*, 2006). Der gleiche Effekt kann auch in ganzen Zellen beobachtet werden, wenn *betP* heterolog in *E. coli* exprimiert und charakterisiert wird, denn die *E. coli* Membran besitzt zu 80% ungeladene Phosphatidylethanolamin-Kopfgruppen, während die *C. glutamicum* Membran ausschließlich negativ geladene Kopfgruppen (Phosphatidylglycerol, Phosphatidylinositol; Cardiolipin) besitzt (Özcan *et al.*, 2007; Romantsov *et al.*, 2007). In *E. coli* Zellen behält der Transporter seine regulatorischen Eigenschaften, die Aktivierungsschwelle und das Aktivitätsoptimum sind jedoch hier zu geringeren Osmolalitäten verschoben.

Die Ionenspezifität der Stimulierung sowie der Einfluss der Membran auf die zur Aktivierung benötigte  $K^+$ -Konzentration impliziert für den Regulationsmechanismus von BetP zwei Punkte: 1) Es muss eine spezifische Kaliumbindestelle in einem cytoplasmatisch gelegenen Proteinbereich von BetP existieren. Diese kann allerdings nur eine geringe Affinität zu dem Kation besitzen, da BetP erst bei 220 mM  $K^+$  halbmaximal aktiviert wird (Rübenhagen *et al.*, 2001). 2) Der kaliumsensitive Bereich steht möglicherweise in direktem Kontakt mit den Kopfgruppen der Membranlipiden. Die Charakterisierung C-terminal verkürzter Mutanten lieferte erste Hinweise darauf, dass die C-Extension von BetP in den Regulationsmechanismus involviert ist. Die Extension von BetP umfasst die Aminosäurereste 546-595 und ist überwiegend positiv geladen. Sowohl *in silico* Strukturvorhersagen als auch erste röntgenkristallographische Daten implizieren, dass die C-terminale Extension eine  $\alpha$ -Helix ausbildet (s. Anhang 6.3; Ressler persönliche

Mitteilung). Wird die C-Domäne um 25 beziehungsweise 45 Aminosäuren verkürzt, so verliert BetP seine Kaliumsensitivität und seine Fähigkeit zur Osmoregulation und ist unabhängig von der externen Osmolalität konstitutiv aktiv (Peter *et al.*, 1998a; Schiller *et al.*, 2004b). Hieraus kann geschlossen werden, dass die C-Domäne direkt oder indirekt in die Kaliumsensorik involviert ist und dass sie notwendig ist, um BetP in seiner inaktiven Konformation zu stabilisieren. Eine systematische ortsgerichtete Mutagenese innerhalb der C-Extension lieferte keine Hinweise auf eine Kaliumbindestelle in den letzten 25 Aminosäureresten. Interessanterweise stellte sich aber heraus, dass verschiedene Substitutionen in der Position E572 nur in der heterologen *E. coli* Membrenumgebung zum Verlust der BetP-Regulation führten, während eine nachhaltige Störung der BetP-Regulation in beiden Membrenumgebungen nur beobachtet wurde, wenn der Helixbrecher Prolin in dieser mittleren Position (E572) oder einer vorderen (Y550) eingeführt wurde (Schiller *et al.*, 2006). Aus diesen Daten wurde Folgendes spekuliert: 1) Nicht das Vorhandensein der C-Domäne und somit einzelner Aminosäurereste, sondern die korrekte Konformation der Domäne ist für die Kaliumsensorik entscheidend. 2) Die C-Extension wird direkt oder indirekt von der Membrenumgebung beeinflusst (Ott, 2005; Schiller *et al.* 2006). Trotz zahlreicher Daten, die für eine direkte Beteiligung der C-Extension an der Kaliumdetektion sprechen, ist offen, ob die Kaliumspezifität alleine durch die C-Domäne oder zusammen mit anderen cytoplasmatischen Proteinbereichen vermittelt wird. Es wäre auch denkbar, dass die C-Domäne nicht selbst als Kaliumsensor fungiert, sondern nur für die Transduktion des Kaliumsignals verantwortlich ist. Anhand einzelner Mutanten mit Aminosäuresubstitutionen in den cytoplasmatischen Schleifen, konnte bislang kein Hinweis auf eine Funktion dieser Proteinbereiche in der Kaliumsensorik gefunden werden (Ott, 2005). Gleiches gilt für die N-terminale BetP Extension, welche 59 Aminosäurereste lang und überwiegend negativ geladen ist. Hier wurde beobachtet, dass die Deletion der Domäne nur zu einer verminderten Sensitivität des Transporters führte, das BetP-Regulationsverhalten *per se* jedoch nicht beeinträchtigt wurde (Peter *et al.*, 1998a). Daher ist es wahrscheinlich, dass die C-terminale Domäne direkt für die Kaliumdetektion von BetP verantwortlich ist.



### 1.5 Ziel der Arbeit

Der Osmosensor und Osmoregulator BetP aus *C. glutamicum* ist eines der am besten untersuchten Aufnahmesysteme für kompatible Solute. In Proteoliposomen wurde gezeigt, dass BetP als aktivierenden Stimulus eine erhöhte interne Kaliumionenkonzentration detektiert. Der Mechanismus der Kaliumsensitivität und die Transduktion des Signals an die katalytische Einheit sind jedoch im Detail noch weitgehend unverstanden. Es gab Hinweise, dass die Konformation der C-terminalen BetP-Extension für eine funktionierende Osmoregulation von BetP essentiell ist und dass die Membranumgebung den Regulationsmechanismus von BetP beeinflussen kann (Ott, 2005; Schiller *et al.*, 2006). Zur weiteren Aufklärung des BetP-Regulationsmechanismus wurden in dieser Arbeit im Wesentlichen drei Fragestellungen bearbeitet: 1) In welcher Weise ist die  $\alpha$ -helikale Konformation der C-terminalen Domäne für den Sensormechanismus wichtig? Dazu wurden der Helixbrecher Prolin sowie zur Kontrolle verschiedene andere Aminosäurereste durch ortsgerichtete Mutagenese systematisch in verschiedenen Positionen der C-Domäne eingeführt und deren Effekt auf die BetP-Regulation untersucht. 2) Wie wird die C-Domäne von den umgebenden Membranlipiden beeinflusst? Hierüber sollte die Charakterisierung der C-terminalen Mutanten in verschiedenen Membranumgebungen Aufschluss geben. Darüber hinaus wurde eine mögliche Interaktion zwischen der isolierten C-Domäne und Lipidoberflächen direkt untersucht. 3) Welche anderen Proteinbereiche sind zusammen mit der C-Domäne in den Regulationsmechanismus involviert? Zum einen wurde hier die weitgehend unbekannte Funktion der N-terminalen BetP-Extension näher analysiert, zum anderen sollten mögliche intramolekulare Interaktionspartner der C-Domäne identifiziert werden. Die Interaktion der C-Domäne mit anderen Proteinbereichen wäre sowohl für die direkte Kaliumdetektion als auch für die indirekte Transduktion des Kaliumsignals denkbar. Ziel der Arbeit war es also, das Zusammenspiel der C-terminalen Domäne mit der Membran im Mechanismus der BetP-Aktivierung näher zu charakterisieren sowie weitere in den Vorgang involvierte Komponenten zu identifizieren, um so ein detailliertes Modell für den Regulationsmechanismus des Transporters zu erhalten. Die Identifizierung der aktivierenden Stimuli für Osmosensoren erfolgte bislang immer nur *in vitro*. Auf Grund aktueller Erkenntnisse zur Kaliumhomöostase in *C. glutamicum* bot sich für BetP jetzt erstmals die Möglichkeit, *in vivo* Beweise für die *in vitro* erhaltenen Daten zu bekommen. So sollte im letzten Teil dieser Arbeit die interessante Frage untersucht werden, ob Kalium auch in lebenden Zellen als Reiz zur BetP-Aktivierung fungiert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2.1, die verwendeten Plasmide in Tabelle 2.2 und die zur Klonierung verwendeten Oligonukleotide in Tabelle 2.3 aufgeführt.

**Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme und deren genetische Eigenschaften.**

<i>E. coli</i>		
▪ DH5 $\alpha$ mcr	<i>endA1 supE44 thi-1<math>\lambda</math> recA1 gyrA96 relA1 deoR <math>\Delta</math>(lacZYA-argF) U169 <math>\Phi</math>80dlacZ <math>\Delta</math>M15 mcrA <math>\Delta</math>(mrr hsdRMS mcrBC)</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
▪ BL21 DE3	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3) mit <math>\lambda</math> T7 rna polymerase</i>	Novagen, Darmstadt
▪ MKH13	<i>araD39 (argF-lac) U169 relA51 rps150 flbB5301 deoC ptsF25 <math>\Delta</math>(putPA)101 V(proP)2 <math>\Delta</math>(proU)</i>	Haardt <i>et al.</i> , 1995
<i>C. glutamicum</i>		
▪ DHPF	Wildtyp ATCC 13032 <i><math>\Delta</math>betP, <math>\Delta</math>proP, <math>\Delta</math>putP, <math>\Delta</math>ectP, <math>\Delta</math>lcoP</i>	Steger, 2002
▪ $\Delta$ cglK/ $\Delta$ kup	ATCC 13032 mit Deletion der Gene <i>cgl0777</i> und <i>cgl0712</i>	Becker, 2007

**Tabelle 2.2: Verwendete Plasmide.**

Plasmid	Resistenz	Eigenschaften	Referenz
pAcl1	Amp <sup>R</sup>	pASK-IBA5 mit <i>betP</i> C252T über die <i>Bsal/HindIII</i> Schnittstellen kloniert; N-terminal Strep-TagII	Rübenhagen <i>et al.</i> , 2001
pAcl1 Y550A	„	pAcl1 mit Kodonaustausch Y550A	diese Arbeit
pAcl1 E555P	„	pAcl1 mit Kodonaustausch E555P	diese Arbeit
pAcl1 E555A	„	pAcl1 mit Kodonaustausch E555A	diese Arbeit
pAcl1 E555R	„	pAcl1 mit Kodonaustausch E555R	diese Arbeit
pAcl1 R558P	„	pAcl1 mit Kodonaustausch R558P	diese Arbeit
pAcl1 R558A	„	pAcl1 mit Kodonaustausch R558A	diese Arbeit
pAcl1 R558D	„	pAcl1 mit Kodonaustausch R558D	diese Arbeit
pAcl1 A564P	„	pAcl1 mit Kodonaustausch A564P	diese Arbeit
pAcl1 A564K	„	pAcl1 mit Kodonaustausch A564K	diese Arbeit
pAcl1 A564D	„	pAcl1 mit Kodonaustausch A564D	diese Arbeit
pAcl1 R565P	„	pAcl1 mit Kodonaustausch R565P	diese Arbeit
pAcl1 E566P	„	pAcl1 mit Kodonaustausch E566P	diese Arbeit
pAcl1 R567P	„	pAcl1 mit Kodonaustausch R567P	diese Arbeit
pAcl1 R568P	„	pAcl1 mit Kodonaustausch R568P	diese Arbeit
pAcl1 R568A	„	pAcl1 mit Kodonaustausch R568A	diese Arbeit
pAcl1 R568D	„	pAcl1 mit Kodonaustausch R568D	diese Arbeit
pAcl1 V569P	„	pAcl1 mit Kodonaustausch V569P	diese Arbeit
pAcl1 H570P	„	pAcl1 mit Kodonaustausch H570P	diese Arbeit
pAcl1 N571P	„	pAcl1 mit Kodonaustausch N571P	diese Arbeit
pAcl1 H573P	„	pAcl1 mit Kodonaustausch H573P	diese Arbeit
pAcl1 R574P	„	pAcl1 mit Kodonaustausch R574P	diese Arbeit
pAcl1 K575P	„	pAcl1 mit Kodonaustausch K575P	diese Arbeit
pAcl1 R576P	„	pAcl1 mit Kodonaustausch R576P	diese Arbeit
pAcl1 R576A	„	pAcl1 mit Kodonaustausch R576A	diese Arbeit
pAcl1 R576E	„	pAcl1 mit Kodonaustausch R576E	diese Arbeit
pAcl1 L578P	„	pAcl1 mit Kodonaustausch L578P	diese Arbeit
pAcl1 A580P	„	pAcl1 mit Kodonaustausch A580P	diese Arbeit
pAcl1 R582P	„	pAcl1 mit Kodonaustausch R582P	diese Arbeit

(Fortsetzung Tabelle 2.2)

Plasmid	Resistenz	Eigenschaften	Referenz
pAcl1 ΔN29	Amp <sup>R</sup>	pAcl1 mit 29 N-terminalen BetP-Aminosäuren deletiert	Ziegler, unveröffentlicht
pASK-IBA7- <i>betP</i> -ΔN29EEE	„	pASK-IBA7 mit <i>betP</i> über die Schnittstellen <i>Bsal/HindIII</i> kloniert, mit Kodonaustausch E44A;E45A, E46A und C252T sowie 29 N-terminalen BetP-Aminosäuren deletiert	Ziegler, unveröffentlicht
pAcl1 ΔN52	„	pAcl1 mit 52 N-terminalen BetP-Aminosäuren deletiert	Ziegler, unveröffentlicht
pAcl1ΔN53	„	pAcl1 mit 53 N-terminalen BetP-Aminosäuren deletiert	Ziegler, unveröffentlicht
pGEX-6P2	„	Expressionsvektor mit <i>Ptac::gst</i> mit C-terminaler Precission Protease Schnittstelle	GE-Healthcare, Freiburg
pGEX- <i>gst-c-betP</i> WT	„	pGEX-6P2 mit <i>gst-c-betP</i> Fusion, <i>c-betP</i> in den Schnittstellen <i>BamH1/EcoR1</i> ; C-terminale BetP Aminosäuren L540–R595 umfassend	Morbach, unveröffentlicht
pGEX- <i>gst-c-betP</i> Y550P	„	pGEX- <i>gst-c-betP</i> , C-BetP mit Kodonaustausch Y550P	Morbach, unveröffentlicht
pGEX- <i>gst-c-betP</i> E572P	„	pGEX- <i>gst-c-betP</i> , C-BetP mit Kodonaustausch E552P	Morbach, unveröffentlicht
pXMJ19	Cm <sup>R</sup>	Expressionsvektor mit <i>ptac, lacI</i> <sup>q</sup>	Jakoby <i>et al.</i> , 1999
pXMJ19- <i>betP</i> C252T	„	pXMJ19 mit <i>betP</i> C252T in den Schnittstellen <i>XbaI/SmaI</i>	Schiller, 2004
pXMJ19 Y550A	„	pXMJ19- <i>betP</i> C252T mit Kodonaustausch Y550A	diese Arbeit
pXMJ19 E555A	„	pXMJ19- <i>betP</i> C252T mit Kodonaustausch E555A	diese Arbeit
pXMJ19 E555R	„	pXMJ19- <i>betP</i> C252T mit Kodonaustausch E555R	diese Arbeit
pXMJ19 A564P	„	pXMJ19- <i>betP</i> C252T mit Kodonaustausch A564P	diese Arbeit
pXMJ19 A564K	„	pXMJ19- <i>betP</i> C252T mit Kodonaustausch A564K	diese Arbeit
pXMJ19 A564D	„	pXMJ19- <i>betP</i> C252T mit Kodonaustausch A564D	diese Arbeit
pXMJ19 V569P	„	pXMJ19- <i>betP</i> C252T mit Kodonaustausch V569P	diese Arbeit
pXMJ19 K575P	„	pXMJ19- <i>betP</i> C252T mit Kodonaustausch K575P	diese Arbeit
pXMJ19 R576P	„	pXMJ19- <i>betP</i> C252T mit Kodonaustausch R576P	diese Arbeit

(Fortsetzung Tabelle 2.2)

Plasmid	Resistenz	Eigenschaften	Plasmid
pXMJ19 ΔN29		pXMJ19- <i>betP</i> mit 29 N-terminalen Aminosäuren deletiert	diese Arbeit
pXMJ19 ΔN29EEE		pXMJ19- <i>betP</i> mit 29 N-terminalen Aminosäuren deletiert und Kodonaustauschen E44A;E45A, E46A	diese Arbeit
pXMJ19 ΔN52		pXMJ19- <i>betP</i> mit 52 N-terminalen Aminosäuren deletiert	diese Arbeit
pXMJ19 ΔN53		pXMJ19- <i>betP</i> mit 53 N-terminalen Aminosäuren deletiert	diese Arbeit

**Tabelle 2.3: Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese.** Aufgelistet sind nur die *sense* Nukleotide. Es wurden jeweils auch die zugehörigen *antisense* Nukleotide mit genau komplementärer Sequenz verwendet. Das kodonaustauschtragende Triplet ist jeweils unterstrichen.

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'
Y550A	agc aat gat gtg atc <u>gcc</u> ctc gag tac cgt gag
E555P	tac ctc gag tac cgt <u>ccg</u> cag caa cgc ttc aac
E555A	tac ctc gag tac cgt <u>gcg</u> cag caa cgc ttc aac
E555R	tac ctc gag tac cgt <u>cgg</u> cag caa cgc ttc aac
R558P	tac cgt gag cag caa <u>ccc</u> ttc aac gcg cgc ctt
R558A	tac cgt gag cag caa <u>gcc</u> ttc aac gcg cgc ctt
R558D	tac cgt gag cag caa <u>gac</u> ttc aac gcg cgc ctt
A564P	ttc aac gcg cgc ctt <u>ccc</u> cgt gaa cgt cgt gtt
A564K	ttc aac gcg cgc ctt <u>aag</u> cgt gaa cgt cgt gtt
A564D	ttc aac gcg cgc ctt <u>gac</u> cgt gaa cgt cgt gtt
R565P	aac gcg cgc ctt gcc <u>cct</u> gaa cgt cgt gtt cac
E566P	gcg cgc ctt gcc cgt <u>cca</u> cgt cgt gtt cac aat
R567P	cgc ctt gcc cgt gaa <u>cct</u> cgt gtt cac aat gaa
R568P	ctt gcc cgt gaa cgt <u>cct</u> gtt cac aat gaa cac
R568A	ctt gcc cgt gaa cgt <u>gct</u> gtt cac aat gaa cac
R568D	ctt gcc cgt gaa cgt <u>gat</u> gtt cac aat gaa cac

(Fortsetzung Tabelle 2.3)

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'
V569P	gcc cgt gaa cgt cgt <u>cct</u> cac aat gaa cac cgc
H570P	cgt gaa cgt cgt gtt <u>ccc</u> aat gaa cac cgc aag
N571P	gaa cgt cgt gtt cac <u>cct</u> gaa cac cgc aag cgt
H573P	cgt gtt cac aat gaa <u>ccc</u> cgc aag cgt gaa ctg
R574P	gtt cac aat gaa cac <u>ccc</u> aag cgt gaa ctg gct
K575P	cac aat gaa cac cgc <u>ccg</u> cgt gaa ctg gct gca
R576P	aat gaa cac cgc aag <u>cct</u> gaa ctg gct gca aag
R576A	aat gaa cac cgc aag <u>gct</u> gaa ctg gct gca aag
R576E	aat gaa cac cgc aag <u>gaa</u> gaa ctg gct gca aag
L578P	cac cgc aag cgt gaa <u>ccg</u> gct gca aag cga cgc
A580P	aag cgt gaa ctg gct <u>cca</u> aag cga cgc agg gag
R582P	gaa ctg gct gca aag <u>cca</u> cgc agg gag cgt aag

## 2.2 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

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

*E. coli* Stämme wurden im Vollmedium Luria Bertani (LB) (10 g/l Bacto Trypton, 5 g/l Bacto Yeast Extract, 10 g/l NaCl) (Sambrook *et al.*, 1989) kultiviert. Zur Herstellung von Festmedium wurden vor dem Autoklavieren 16 g/l Bacto Agar zugesetzt. Die Anzucht zur Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte in SOB-Medium (2% Bacto Trypton, 0,5% Bacto Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) (Hanahan, 1985). Nach der Transformation wurden die Zellen in das Regenerationsmedium SOC (SOB mit 20 mM Glucose) (Hanahan, 1985) überführt. Zur Kultivierung von *E. coli* zum Zwecke der DNA-Isolierung wurde LB-Medium verwendet.

Die Kultivierung von *C. glutamicum* vor der Durchführung biochemischer Versuche erfolgte in dem Komplexmedium BHI (Brain Heart Infusion, Difco Laboratories, Detroit, USA oder in dem Mineralsalzmedium (MMI, modifiziert nach Kase und Nakayama; s. u.). Bei der Kultivierung des Stammes *C. glutamicum*  $\Delta$ cgIK/ $\Delta$ kup wurde das BHI Medium mit

100 mM KCl versetzt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in das Regenerationsmedium BHIS (BHI + 0,5 M Sorbitol) überführt.

Die Zusammensetzung des Mineralsalzmediums ist in Tabelle 2.4 angegeben. Stammlösung, Spurenelementlösung sowie Glukose, CaCl<sub>2</sub>, und MgSO<sub>4</sub> wurden getrennt angesetzt und autoklaviert. Biotin wurde separat sterilfiltriert. Für die Kultivierung von *C. glutamicum* ohne Zugabe von Kalium wurde die alternative Stammlösung verwendet, in welcher KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> durch NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> äquimolar ersetzt wurden.

**Tabelle 2.4: Zusammensetzung des Mineralsalzmediums I**

	<b>Substanz</b>	<b>Endkonzentration</b>
<b>Stammlösung</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g/l
	Harnstoff	5 g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 g/l
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	5 g/l
<b>alternative Stammlösung (K<sup>+</sup>-frei)</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g/l
	Harnstoff	5 g/l
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,23 g/l
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	1,63 g/l
<b>Spurenelementlösung</b>	FeSO <sub>4</sub>	10 mg/l
	MnSO <sub>4</sub>	10 mg/l
	ZnSO <sub>4</sub>	1 mg/l
	CuSO <sub>4</sub>	0,2 mg/l
	NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,02 mg/l
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,09 mg/l
	CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,06 mg/l
	NaMoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,009 mg/l
	Glukose	40 g/l
	Biotin	200 µg/l
	CaCl <sub>2</sub>	0,01 g/l
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,25 g/l

### 2.2.2 Medienzusätze

Die Selektion rekombinanter Stämme erfolgte durch die Zugabe von sterilfiltriertem Carbenicillin (50 µg/ml) beziehungsweise Chloramphenicol (20 µg/ml) zu den jeweiligen autoklavierten Medien. Die Expression von *betP* unter Kontrolle des Tetrazyklinpromotors erfolgte durch Zugabe von 200 µg/l AHT zum Medium. Zur Expression von *betP* unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors im Vektor pXMJ19 wurde dem Medium 250 µM IPTG zugesetzt. Zur Expression von *gst-c-betP* unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors im Vektor pGEX-6P2 wurden dem Medium 100 µM IPTG zugesetzt.

### 2.2.3 Kultivierungsbedingungen

*E. coli* wurde bei 37° C aerob kultiviert, d. h. unter Schütteln bei 125 Upm. Die Kultivierung von *C. glutamicum* erfolgte ebenfalls aerob bei 30° C und 125 Upm. Durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) (Spektrophotometer Novaspec II, Pharmacia Biotech Inc.) wurde die Zelldichte der Bakterienkulturen photometrisch bestimmt. Eine  $OD_{600}$  von 1 entspricht dabei etwa  $10^9$  Zellen pro ml (Miller, 1992). Zur Lagerung der verschiedenen Bakterienstämme wurden Glycerindauerkulturen aus Übernachtskulturen mit einer Glycerinendkonzentration von 60% angelegt. Die kurzfristige Lagerung erfolgte bei -20°C, die langfristige bei -80°C.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Herstellung transformationskompetenter Zellen und Transformation

Transformationskompetente Zellen des *E. coli*-Stammes DH5amcr wurden nach der Methode von Inoue *et al.* (1990) hergestellt und transformiert. Dafür wurden 250 ml SOB-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,4% NaCl, 10 mM  $MgCl_2$ , 2,5 mM KCl) mit 1 ml einer über Tag bei 37°C gewachsenen Kultur angeimpft und über Nacht bei RT und 200 Upm bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden zentrifugiert (2000 g, 10 min, 4°C), in 4°C kaltem TB-Puffer (10 mM Pipes (pH 6,7), 250 mM KCl, 55 mM  $MnCl_2$ , 15 mM  $CaCl_2$ ) gewaschen und in 20 ml TB-Puffer (4°C) resuspendiert. 1,4 ml DMSO wurden tropfenweise hinzugegeben, bevor die kompetenten Zellen aliquotiert in flüssigem



Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden. Zur Transformation wurden  $50\ \mu\text{l}$  der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut,  $4\text{-}12\ \mu\text{l}$  Ligationsansatz bzw. Plasmid hinzugegeben und für  $30\ \text{min}$  auf Eis inkubiert. Zur Erhöhung der Transformationseffizienz wurden die Zellen anschließend  $45\ \text{sec}$  bei  $42^{\circ}\text{C}$  geschockt. Zu dem Ansatz wurden dann  $900\ \mu\text{l}$  SOC-Medium (SOB-Medium +  $0,36\%$  Glukose) hinzugegeben und die Zellen für  $1\ \text{h}$  bei  $37^{\circ}\text{C}$  geschüttelt. Die Zellen wurden auf LB-Agar-Platten ( $50\ \mu\text{g/ml}$  Carbenicillin oder  $20\ \mu\text{g/ml}$  Chloramphenicol) ausgestrichen und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

Für die Herstellung kompetenter *E. coli* MKH13 sowie *E. coli* BL21 Zellen wurde die Methode von Chung *et al.* (1989) eingesetzt.  $10\ \text{ml}$  LB-Medium wurden mit  $100\ \mu\text{l}$  einer ÜN-Kultur angeimpft und bei  $37^{\circ}\text{C}$  und  $125\ \text{Upm}$  bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von ca.  $0,4$  geschüttelt. Pro Transformationsansatz wurde  $1\ \text{ml}$  abgenommen, der für  $10\ \text{min}$  bei  $2000\ \text{g}$  ( $4^{\circ}\text{C}$ ) zentrifugiert wurde. Das Sediment wurde in  $100\ \mu\text{l}$  TSS (LB-Medium,  $10\%$  PEG,  $5\%$  DMSO,  $50\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ) resuspendiert. Nach Zugabe von  $1\ \mu\text{l}$  Plasmid wurde der Ansatz für  $30\ \text{min}$  bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert.  $900\ \mu\text{l}$  SOC-Medium wurden hinzugegeben und  $1\ \text{h}$  bei  $37^{\circ}\text{C}$  bei  $125\ \text{Upm}$  geschüttelt.  $200\ \mu\text{l}$  des Ansatzes wurden auf LB-Agar-Platten ( $50\ \mu\text{g/ml}$  Carbenicillin) ausgestrichen und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

Kompetente Zellen von *C. glutamicum* wurden nach der Methode von Liebl *et al.* (1989) modifiziert durch van der Rest *et al.* (1999) hergestellt und durch Elektroporation bei  $2,5\ \text{kV}$  mit einem Bio-Rad Mirco Pulser (Bio-Rad, München) mit je  $1\ \mu\text{l}$  Plasmid pro Ansatz transformiert.

### **2.3.2 Plasmidpräparation aus *E. coli* und *C. glutamicum***

Die Plasmidpräparationen erfolgten nach der Methode der alkalischen Lyse. Für die Plasmid-Mini-Präparation aus *E. coli* wurde das Kit „Nucleo Spin Plasmid Quick Pure“ der Firma Macherey-Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Plasmidpräparation aus *C. glutamicum* wurde mit dem QIAprep Plasmid Spin Kit (QIAGEN, Hilden) durchgeführt. Dabei wurden folgende Modifikationen des Ausgangsprotokolls vorgenommen: Die Zellen wurden in der doppelten Menge Puffer P1, der mit  $15\ \text{mg/ml}$  Lysozym versetzt war, resuspendiert und für mindestens  $60\ \text{min}$  bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter Schütteln inkubiert. Die Volumen der folgenden Puffer P2 und P3 wurden ebenfalls verdoppelt. Der optionale Waschschrift in der Herstellervorschrift wurde grundsätzlich durchgeführt. Die mit den genannten Methoden isolierte Plasmid-DNA konnte direkt zur Elektroporation oder Sequenzierung eingesetzt werden.

### 2.3.3 Modifikation von DNA

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

### 2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA erfolgte elektrophoretisch in 0,8-2% (w/v)-TAE-Agarosegelen (TAE-Puffer: 40 mM Tris, 2 mM EDTA pH 8,0; 20 mM Essigsäure) nach Sambrook *et al.* (1989). Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das „Nucleo Spin extract II“ -Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden alle optionalen Waschschriffe durchgeführt.

### 2.3.5 Ortsgerichtete Mutagenese

Zur Konstruktion der einzelnen Mutanten wurde eine Methode in Anlehnung an das „QuickChange Site-Directed-Mutagenesis-Kit“ der Firma Stratagene verwendet. Mit Hilfe der in Tabelle 2.3 aufgeführten Oligonukleotide wurden die gewünschten Mutationen in den Vektor pASK-IBA5-*betP* C252T eingeführt. Hierzu wurde eine PCR-ähnliche Reaktion durchgeführt, wobei die mutationstragenden Oligonukleotide als Primer und der methylierte Vektor (Plasmidpräparation aus *E. coli* DH5 $\alpha$ mc $\alpha$ r) als Matrize dienten (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988). Es wurden „genickte“ Einzelstränge amplifiziert, die das gesamte Plasmid umfassten. In einem 50  $\mu$ l PCR-Ansatz wurden 1  $\mu$ l Vektor, je 2,5  $\mu$ l Primer (10  $\mu$ M), 1,2  $\mu$ l eines dNTP-Gemisches (je 10 mM dATP, dCTP, dTTP, dGTP; Sigma, Deisenhofen), 1  $\mu$ l *Pfu-Turbo*-DNA-Polymerase (Stratagene) und 5  $\mu$ l des 10fach konzentrierten Polymerasepuffers gemischt und die PCR gestartet. Die gewählte *annealing*-Temperatur richtete sich nach dem verwendeten Primerpaar. Es wurden 18 Zyklen bestehend aus Denaturierung (30 sec, 95°C), Anlagerung der Desoxynukleotide (i.d.R. 55°C als Durchschnittswert, 60 sec) und Elongation (68°C, 12 min), durchgeführt. Zur Durchführung wurde der Thermocycler der Firma PE Applied Biosystems, Weiterstadt (GeneAMPPCR System 9700) benutzt. Nach der PCR wurden die methylierten Matrizenstränge mit *DpnI* verdaut und die verbliebenen linearen PCR-Produkte, in den

Stamm *E. coli* DH5 $\alpha$ mc $r$  transformiert. In den Zellen wurden die *nicks* durch zelleigene Ligase verbunden und das auf diese Weise wiederhergestellte Plasmid amplifiziert. Die erfolgreiche Mutagenese wurde durch Sequenzierung der *betP*-Sequenz im Bereich des jeweiligen Basenaustausches überprüft. Um auszuschließen, dass während der PCR unerwünschte Basenaustausche in anderen Sequenzbereichen stattgefunden haben, wurden die Genabschnitte, welche die mutierten Sequenzen trugen, mit Hilfe der in Tabelle 2.5 angegebenen Restriktionsendonukleasen ausgeschnitten. Die Größen der resultierenden Fragmente sind ebenfalls in Tabelle 2.5 angegeben. Die Fragmente wurden in den jeweils mit den gleichen Enzymen geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pASK-IBA5-*betP* C252T ligiert und in DH5 $\alpha$ mc $r$  transformiert. In diesem Vektor war zuvor das *betP*-Gen vollständig sequenziert worden. Hierdurch mussten in den konstruierten Plasmiden nur noch die Ligationsstellen durch Sequenzierung überprüft werden. Die Plasmide erhaltenen sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Zur Reinigung von BetP-Varianten wurden die Plasmide in DH5 $\alpha$ mc $r$  transformiert. Zur Durchführung von Transportmessungen wurden die Plasmide in *E. coli* MKH13 transformiert.

Für Transportmessungen in *C. glutamicum* DHPF Zellen wurden die mutierten *betP*-Gene in den Vektor pXMJ19 kloniert. Hierzu wurden die *strep-betP* Gene mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Nae*I aus dem pASK-IBA5 Vektor ausgeschnitten und in den mit *Xba*I und *Sma*I geschnittenen und dephosphorylierten Zielvektor ligiert. Die erfolgreiche Umklonierung wurde durch einen Testverdau mit den Enzymen *Eco*RV und *Xho*I überprüft. Die erhaltenen rekombinanten pXMJ19-*strep-betP*-Vektoren wurden dann in *C. glutamicum* DHPF Zellen transformiert.

**Tabelle 2.5: Verwendete Restriktionsenzyme für die Klonierung.**

Substituierter Rest	Enzym 1	Enzym 2	Fragmentgröße [bp]
Y550	<i>Afl</i> II	<i>Hind</i> III	160
E555-R582	<i>Xho</i> I	<i>Hind</i> III	138

### 2.3.6 DNA-Sequenzierung

Nach ortsgerichteter Mutagenese und Klonierungen wurden die jeweils konstruierten Plasmide sequenziert, um zu überprüfen ob einerseits die gewünschten Mutationen vorlagen und andererseits keine unerwünschten Fehler bei der Amplifizierung bzw. Klonierung der Plasmide aufgetreten waren. Die Sequenzierreaktion basiert auf der

Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) und wurde nach Zimmermann *et al.* (1990) modifiziert. Bei dieser Methode wird der Kettenabbruch von Didesoxynukleotiden ausgelöst, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die Sequenzierung erfolgte durch das bioanalytische Labor des ZMMK in der Universität zu Köln.

## 2.4 Allgemeine analytische Methoden

### 2.4.1 Proteinbestimmungen

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung von Proteinrohextrakten sowie gereinigten cytosolischen Proteinen wurde die Methode nach Bradford (1976) angewendet. Hierzu wurden 100 µl Probe mit 900 µl Bradfordreagenz (10% (v/v) 85%ige H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 5% (v/v) Ethanol; 0,007% (w/v) Serva Blue) versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Dann wurde die Extinktion bei 595 nm bestimmt. Zur Erstellung der Eichreihen wurde BSA bekannter Konzentration eingesetzt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen in Membranpräparationen und Proteoliposomen wurde die Amido-Schwarz-Methode nach Schaffner und Weissmann (1973) angewendet, da bei dieser Methode die im Ansatz enthaltenen Lipide die Konzentrationsbestimmung nicht beeinflussen. Zur Erstellung der Eichreihen wurde BSA bekannter Konzentration eingesetzt.

### 2.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bakterielle Proteine oder Zellextrakte aus *E. coli* und *C. glutamicum* wurden in 12,5%igen oder 15%igen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970) elektrophoretisch getrennt. Die Proteine wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 4-fach konzentriertem Probenpuffer (20% Glycerin, 8% SDS, 400 mM Tris/HCl (pH 6,8) 10 mM EDTA, 100 µM β-Mercaptoethanol, Bromphenolblau) versetzt. Der direkte Nachweis der Proteine in den Gelen erfolgte mittels Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung (Sambrook *et al.*, 1989) oder für geringe Proteinmengen durch Silberfärbung nach Blum *et al.* 1987.

### 2.4.3 Immunologischer Nachweis von BetP-Varianten im Western Blot

Zellanzucht und Induktion erfolgten analog zur Anzucht für Transportmessungen. Die Zellen wurden in 25 mM  $KP_i$  bei 4°C gewaschen und in Aufschlusspuffer (25 mM  $KP_i$ , pH 7,5, 2 µg/ml DNase; Proteaseinhibitor Complete (Firma Roche, Mannheim), 1 mM EDTA) resuspendiert. Der anschließende Zellaufschluss erfolgte ebenfalls bei 4°C mit Hilfe von Glasperlen in einer „FastPrepFP120“ (Bio 101, Thermo Savant, 4x 30 sec, Stufe 6,5 mit Zwischenkühlen). Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (10 min; 1400 g, 4°C). Zur Trennung von cytosolischer Fraktion und Membranfraktion wurde der Proteinrohextrakt bei 4 °C und 348 000 g für 40 min zentrifugiert. Der cytosolische Überstand wurde verworfen. Das Membranpellet wurde in Aufschlusspuffer resuspendiert. Diese Membranfraktionen wurden über eine 12,5%ige SDS-PAGE (Laemmli, 1970) getrennt. Zum immunologischen Nachweis der Proteine mit Antikörpern wurde die Methode von Towbin *et al.* (1979) verwendet. Die Übertragung der Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran wurde mit dem *semi-dry*-Blotverfahren (Kyhse-Andersen, 1984) durchgeführt. Die Blockierung von freien Bindungsstellen auf der Membran erfolgte mit 3% (w/v) Milchpulver in Waschpuffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,9% NaCl). Der anschließende immunologische Nachweis von BetP-Varianten erfolgte mit polyklonalen Antikörpern gegen BetP (Rabbit 2379; Verdünnung 1:50 000 in Blockierlösung) und dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (Firma Sigma, Steinheim); Verdünnung 1:10 000 in Blockierlösung). Der kolorimetrische Nachweis erfolgte durch die Reaktion der alkalischen Phosphatase mit BCIP/NBT (Sigma Fast-Tabletten, Sigma, Steinheim). Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von H<sub>2</sub>O gestoppt.

### 2.4.4 Immunologischer Nachweis von rekombinanten GST-Proteinen im Western Blot

Proteinrohextrakt wurde wie unter Punkt 2.5.1 beschrieben hergestellt. Der Proteinrohextrakt sowie die verschiedenen Fraktionen aus der Proteinreinigung (Durchfluss-, Wasch-, Elutionsfraktionen) wurden über eine 12,5%ige SDS-PAGE (Laemmli, 1970) getrennt. Die Übertragung der Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran wurde mit dem *semi-dry*-Blotverfahren (Kyhse-Andersen, 1984) durchgeführt. Die Blockierung von freien Bindungsstellen auf der Membran erfolgte mit 3% (w/v) Milchpulver in Waschpuffer (10 mM Tris/Cl pH 7,5, 0,9% NaCl). Der anschließende immunologische Nachweis der rekombinanten Proteine erfolgte mit einem

polyklonalen Antikörpern gegen GST (Firma GE-Healthcare, Freiburg, Verdünnung 1:2 000 in Blockierlösung) und dem sekundären Antikörper (Anti-Ziege-HRP-Konjugat, Firma Sigma Aldrich, Steinheim; Verdünnung 1:50 000 in Blockierlösung). Die Entwicklung erfolgte über die Peroxidasereaktion unter Verwendung des Kits „Uptilight HRP Blot Chemiluminescent Substrate“ (Firma Uptima Interchim, Montluçon, Frankreich). Die Chemolumineszenz wurde durch eine hochauflösende Kamera (LAS1000, FujiFilm) nachgewiesen.

### **2.4.5 Bestimmung der Osmolalität**

Zur Bestimmung der Osmolalität eines Puffers oder Mediums wurde ein Osmometer (Osmomat 030, Gonotec, Berlin) nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Standard wurde eine Eichlösung mit 400 mosm (nach Herstellerangaben) verwendet.

### **2.4.6 Bestimmung der Biotrockenmasse**

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) wurden 2 ml Kultur bekannter OD<sub>600</sub> durch einen zuvor ausgewogenen Glasfaserfilter (Firma Millipore, Schwalbach) abfiltriert und mit 2 ml 0,9%iger Saline gewaschen. Der Filter wurde mindestens 36 h bei 60°C getrocknet und das Trockengewicht als Differenz zum Filterleergewicht bestimmt. Mit Hilfe der bekannten OD<sub>600</sub> der eingesetzten Kultur konnte auf den Umrechnungsfaktor von OD<sub>600</sub> in BTM mit der Einheit mg/(ml OD1) geschlossen werden.

### **2.4.7 Bestimmung der Kaliumkonzentration in Zellen und Überständen**

Die Kaliumkonzentration wurden mittels Atomemissionsspektrometrie (Flammphotometer ELEX 6361, Firma Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Die Messungen erfolgten ohne Verwendung eines Leitlinienelementes bei Verstärkung des Kaliumsignals (K<sup>+</sup> Kennzahl: 5,997). Die Proben wurden bei einer Kaliumkonzentration von mehr als 300 µM mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> nochmals verdünnt. Bei der Probennahme wurden 2 ml einer in Puffer gewaschenen Zellkultur abgenommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß (RG) überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (3 min, 14000 Upm, 4°C), 1,5 ml des Überstandes wurden in ein neues RG überführt und erneut abzentrifugiert (6 min, 14000 Upm, 4°C). Von diesem Überstand wurden 1,2 ml für die Messung verwendet. Der nach der ersten

Zentrifugation auf dem Zellpellet verbliebene Überstand wurde sorgfältig abgesaugt. Vor dem Zellaufschluss wurde das Pellet in 1,7 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte im Ultraschallbad bei 85°C, 20 min. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (30 min, 4°C, 14000 Upm) und 1,2 ml des Überstandes wurden für die Messung abgenommen. Diese Messungen wurden von Markus Becker (Arbeitskreis Krämer, Universität zu Köln) durchgeführt.

## 2.5 Biochemische Methoden

### 2.5.1 Isolierung des GST-C-BetP-Fusionsproteins

Die Isolierung des rekombinanten Proteins erfolgte aus *gst-c-betP* überexprimierenden *E. coli* BL21 Zellen. Hierzu wurde aus einer ÜN-Kultur LB-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C und 125 Upm bis zu einer OD von 0,5 wachsen gelassen. Dann wurde die Expression des Zielproteins mit 100 µM IPTG (Firma Roth, Karlsruhe) induziert und die Zellen wurden für weitere 3 h kultiviert. Alle folgenden Schritte erfolgten bei 4°C. Die Zellernte erfolgte bei 4500 Upm (Avanti Centrifuge J25, Beckman, Rotor JLA 10.500) für 25 min. Die Zellen wurden in PBS-Puffer (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3) und für den Zellaufschluss in PBS mit 1% Triton-X-100, 2 µg/ml DNase, Complete-Proteaseinhibitor und 1 mM EDTA resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit einer „French Press“ bei einem Druck von 1100 psi (3 Durchgänge; SLM Aminco, Rochester, USA). Anschließend wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (Avanti Centrifuge J25, Beckman, Rotor JA 25.50; 12,500 Upm; 15 min, 4°C). Die Reinigung des rekombinanten Proteins aus dem Proteinrohextrakt erfolgte über Affinitätschromatographie auf einer Glutathion-Sepharose-Säule (Glutathion-Sepharose 4B, Firma GE-Healthcare, Freiburg). Diese Methode nutzt die Affinität der Glutathion-S-Transferase zu seinem natürlichen Liganden Glutathion aus, welches kovalent an die Sepharosesäule gebunden ist. Die Säule wurde mit 8 Säulenvolumen PBS-Puffer (+EDTA, Triton s.o.) äquiliert, der Proteinrohextrakt wurde mit 3 Tropfen/min auf die Säule aufgetragen und anschließend mit 8 Säulenvolumen PBS-Hochsalzpuffer (PBS + Triton + EDTA (s.o.) + NaCl *ad* 500 mM) gewaschen und mit 8 Säulenvolumen auf 50 mM Tris/Cl, pH 8,6; 1 mM EDTA, 150 mM NaCl umäquiliert. Die Elution des Zielproteins erfolgte in diesem Puffer mit 10 mM Glutathion (reduzierte Form). Der Überschuss an freiem Glutathion im Elutionspuffer verdrängt den an die Säule gebundenen Liganden vom GST-Protein und löst dieses somit von der Säule. Die

Reinigung des Proteins wurde mittels SDS-PAGE (12,5%ige Gele) mit anschließender Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung oder Western Blot Analyse (siehe Punkt 2.4.4) kontrolliert. Die Regeneration der Säule erfolgte durch Waschen der Säule mit 5 M Guanidiniumhydrochlorid.

### 2.5.2 Isolierung der BetP-C-Domäne aus dem GST-C-BetP-Fusionsprotein

Zur Isolierung der C-Domäne wurde das eluierte Fusionsprotein durch Dialyse in den für die ortsgerichtete Proteolyse benötigten Puffer überführt. Das für die Rechromatographie störende Glutathion wurde dabei entfernt. Die Dialyse erfolgte über 18 Stunden in drei Schritten gegen 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (1000faches Volumen) unter Verwendung von Spectra Por Float-A-Lyzer Dialyseeinheiten (MWCO 10000, Firma Spectrum, Breda, Niederlande). Danach wurde das Zielprotein durch die Precission-Protease vom GST-Protein abgespalten. Es wurden 6 Units/mg Protein eingesetzt, die Protease wurde durch Zugabe von 1 mM DTT aktiviert. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 4°C. Der Proteolyseansatz wurde dann auf eine voräquilibrierte Glutathion-Sepharose-Säule (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA) mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 Tropfen/min aufgetragen. Die nicht an die Säule bindende und vom GST-Protein abgespaltene BetP-C-Domäne wurde mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA in 1 ml Fraktionen von der Säule gewaschen. Die Reinheit der Fraktionen wurde über SDS-PAGE (15%ige Gele) und anschließender Silberfärbung überprüft. Alle ausschließlich C-Domäne enthaltenden Fraktionen wurden dann über eine C18-*reversed-phase*-Kartusche (SepPak C18plus, Waters, Eschborn) entsalzt und ankonzentriert. Hierzu wurde die Kartusche mit 5 ml Methanol aktiviert, mit 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gewaschen. Das Protein wurde tropfenweise aufgetragen und erneut mit 20 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gewaschen. Die Elution erfolgte durch Methanol/Essigsäure Gemische in folgender Reihenfolge und Zusammensetzung: MeOH:H<sub>2</sub>O:HAc // 70:30:0 (1ml) , MeOH:H<sub>2</sub>O:HAc // 80:20:0 (1ml), MeOH:H<sub>2</sub>O:HAc // 80:15:5 (2ml). Das Lösungsmittelgemisch wurde im Evaporator (Eppendorf, Concentrator 5301) bei RT abgedampft und das Zielprotein im gewünschten Puffer aufgenommen.

### 2.5.3 Membranpräparationen für die Isolierung von Strep-BetP

Für die Präparation von Plasmamembranen aus *betP*-exprimierenden *E. coli* DH5α Zellen wurde LB-Medium (50 µg/ml Carbenicillin) mit einer Übernacht-Kultur 1:30 angeimpft und



bei 37°C und 125 Upm geschüttelt. Bei einer OD<sub>600</sub> von circa 1 wurde die Kultur mit AHT (IBA, Göttingen) in einer Endkonzentration von 200 µg/l induziert und für weitere 3 h geschüttelt. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst zentrifugiert und mit 100 mM KP<sub>i</sub>-Puffer (pH 7,5) gewaschen, bevor sie in 100 mM KP<sub>i</sub> (pH 7,5) mit DNase (2 µg/ml) und dem Proteaseinhibitor Complete resuspendiert wurden. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit einer „French Press“ (3 Durchgänge; SLM Aminco, Rochester, USA) bei einem Druck von 1100 psi. Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurden die Membranen bei 300 000 g für 50 min sedimentiert, mit dem oben aufgeführten Puffer gewaschen, anschließend in 1-2 ml Puffer pro Liter eingesetzter Zellkultur resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### **2.5.4 Isolierung von Strep-BetP über StrepTactin-Affinitätschromatographie**

Die Isolierung von BetP-Varianten erfolgte über das *Strep*-tagII-Peptid (NH<sub>2</sub>-WSHPQFEK-COOH; IBA, Göttingen, Schmidt *et al.* 1996), welches die BetP-Varianten an ihrem N-Terminus tragen. Der *Strep*-tagII bindet mit hoher Spezifität an StrepTactin (Voss und Skerra, 1997). Diese Bindung kann mit Desthiobiotin aufgehoben werden, da Desthiobiotin mit höherer Affinität an StrepTactin bindet als das *Strep*-tagII-Peptid. Die im Folgenden beschriebenen Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Zur Solubilisierung der präparierten Membranen wurden die Membransuspensionen mit folgenden Reagenzien zweifach verdünnt, so dass eine Endkonzentration von 50 mM KP<sub>i</sub> (pH 8,0), 200 mM NaCl, 8,6% Glycerin, 1 mM EDTA erreicht wurde. Anschließend wurde das Detergenz Dodecylmaltosid unter Rühren tropfenweise bis zu einer Endkonzentration von 2% (v/v) hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde für mindestens 30 min bei 4°C unter Rühren inkubiert, bevor das Solubilisat bei 86 900 g für 20 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde mit 50 mM KP<sub>i</sub>-Puffer (pH 8,0), 200 mM NaCl, 8,6% Glycerin, 1 mM EDTA vier- bis fünffach verdünnt, um die Detergenzkonzentration herabzusetzen. Das Säulenmaterial (mit StrepTactin beladene Sepharose; IBA, Göttingen) wurde mit 50 mM KP<sub>i</sub>-Puffer (pH 8,0), 200 mM NaCl, 8,6% Glycerin, 1mM EDTA, 0,1% Dodecylmaltosid äquilibriert. Das verdünnte Solubilisat wurde auf die Säule aufgetragen, wobei die Durchflussrate auf 2-3 Tropfen/min eingestellt wurde. Anschließend wurde die Säule mit 10 Säulenvolumen 50 mM KP<sub>i</sub>-Puffer (pH 8,0), 500 mM NaCl, 8,6% Glycerin, 1 mM EDTA und danach mit 3 Säulenvolumen 50 mM KP<sub>i</sub>-Puffer (pH 8,0), 200 mM NaCl, 8,6% Glycerin, 1 mM EDTA

gewaschen. Das gebundene Protein wurde im gleichen Puffer, der zusätzlich 5 mM Desthiobiotin enthielt, bei einer Durchflussrate von 3 Tropfen/min eluiert. Zur Regeneration der Säule wurde das Desthiobiotin mit 10 Säulenvolumen 50 mM  $KP_i$ -Puffer (pH 8,0), 200 mM NaCl, 8,6% Glycerin, 1 mM EDTA, 1 mM HABA verdrängt und anschließend das StrepTactin-Material zur Wiederverwendung mit mindestens 10 Säulenvolumen 50 mM  $KP_i$ -Puffer (pH 8,0), 200 mM NaCl, 8,6% Glycerin, 1 mM EDTA gewaschen.

### 2.5.5 Präparation von Liposomen

Zur Herstellung von Liposomen wurde *E. coli polar total lipid extract* (AvantiPolar Lipids, Inc., USA), die synthetischen Phospholipide DOPG (1,2-Dioleoyl-sn-Glycerol-3-Phosphat) und DOPS (1,2-Dioleoyl-sn-Glycerol-3-Phosphoserin) sowie ein Gemisch aus DOPE (1,2-Dioleoyl-sn-Glycerol-3-Phosphoethanolamin) und DOPC (1,2-Dioleoyl-sn-Glycerol-3-Phosphocholin) verwendet. Alle Lipide waren in Chloroform suspendiert. Das Lösungsmittel wurde am Vakuumrotationsverdampfer abgezogen. Anschließend wurden die Lipide bis zur Trockene über Nacht lyophilisiert. Die Lipide wurden in 100 mM  $KP_i$ -Puffer pH 7,5, 2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol unter starkem Rühren resuspendiert (20 mg Lipid/ml), aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, mit gasförmigem  $N_2$  überschichtet und bei  $-80^\circ C$  gelagert.

### 2.5.6 Rekonstitution von Strep-BetP in Liposomen

Der Einbau von Strep-BetP in Liposomen erfolgte nach der Methode von Rigaud *et al.* (1995). Zur Rekonstitution des Proteins in Liposomen wurden diese in 100 mM  $KP_i$  (pH 7,5) auf eine Konzentration von 5 mg/ml verdünnt und vierzehnmal durch einen Polycarbonatfilter extrudiert (Porengröße: 400 nm). Die extrudierten Liposomen wurden durch Zugabe von Triton X-100 bis kurz über den Punkt der Detergenzsättigung titriert. Verfolgt wurde die Insertion des Detergenz in die Liposomen durch eine Trübungsmessung bei 540 nm. Anschließend wurde gereinigtes BetP im Lipid-Protein-Verhältnis (LPR) von 30:1 (w/w) zugegeben und die Suspension unter leichtem Schütteln für 15 min bei RT inkubiert. Zum Entzug des Detergenz wurde der Ansatz mit  $x$  mg Polystyrolkugeln (Biobeads, Nassgewicht; BioRad, München;  $x$  = eingesetzte  $\mu$ l Triton X-100 \* 5 + eingesetzte  $\mu$ g Dodecylmaltosid \* 10) zweimal für je 1 h bei RT, einmal mit der doppelten Menge Biobeads für bei  $4^\circ C$  über Nacht und anschließend wieder mit der

einfachen Menge Biobeads für 45 min bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Abtrennung der Biobeads wurden die Proteoliposomen zentrifugiert (353 000 g, 20 min, 15°C), zweimal mit 100 mM  $KP_i$  (pH 7,5) gewaschen, im gleichen Puffer resuspendiert (60  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Lipid), aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### **2.5.7 Variation der Lipidzusammensetzung der Liposomenmembran und Variation des internen Liposomenpuffers**

Zur Variation der Lipidzusammensetzung durch Liposomenfusion wurden Liposomen aus *E. coli* Phospholipiden oder DOPE/DOPC (für SPR-Experimente 2.6.3) mit Liposomen aus DOPG oder DOPS in den angegebenen Verhältnissen gemischt, extrudiert (400 nm Membran), für ca. 1 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei RT langsam aufgetaut (ca. 45 min). Zur Variation des internen Puffers wurde ein aufgetautes Liposomen-Aliquot pelletiert (353.000g, 20 min, 20°C). Das Pellet wurde im gewünschten Puffer aufgenommen. Dann wurden die Lipide siebzehnmals extrudiert, ca. 1 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren und wieder langsam bei RT aufgetaut. Dieses Prozedere wurde zweimal wiederholt.

### **2.5.8 Beladen von Proteoliposomen mit Peptiden**

Zum Einschleusen von Peptiden wurde ein Aliquot Proteoliposomen (i.d.R. 70  $\mu\text{l}$ ) aufgetaut, pelletiert (353.000g, 20 min, 20°C) und mit einer bezogen auf die gewünschte Endkonzentration dreifach konzentrierten Peptidlösung (Puffer für Peptidlösung 100 mM  $KP_i$ , pH 7,5; Berechnung der Konzentration s.u.) in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$  resuspendiert. Nach 3 Zyklen von Frieren in flüssigem Stickstoff und langsamem Auftauen wurde die Suspension mit 100 mM  $KP_i$ -Puffer auf 300  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und durch einen Polycarbonatfilter siebzehnmals extrudiert (Porengröße: 400 nm). Anschließend wurden die Proteoliposomen zweimal in 100 mM  $KP_i$ -Puffer gewaschen und wieder in 70  $\mu\text{l}$  resuspendiert und für Transportmessungen (s. 2.5.11.5) verwendet. Die molare Endkonzentration der Peptide wurde zehnfach oder dreißigfach höher gewählt als die BetP-Konzentration bezogen auf das Innenvolumen der Liposomen, welches ausgehend von folgenden Annahmen berechnet wurde. Die Liposomenform ist eine Kugel. Ein 70  $\mu\text{l}$  Liposomenaliquot enthält 4,2  $\mu\text{g}$  Lipide. Das durchschnittliche Molekulargewicht eines Phospholipides beträgt 1 kDa und der Flächenbedarf auf der Kugeloberfläche 70  $\text{Å}^2$ . Hieraus ergibt sich ein Liposomenvolumen von 59  $\mu\text{l}$  je 4,2  $\mu\text{g}$  Lipid.

### 2.5.9 Nachweis der Orientierung von Strep-BetP in Proteoliposomen

Die Orientierung von BetP in Proteoliposomen wurde über die Zugänglichkeit der N-terminalen Domäne von BetP durch ortsspezifische Proteolyse in solubilisiertem und rekonstituiertem BetP bestimmt. Zwei in 100 mM  $KP_i$  vorliegenden Proteoliposomenaliquots wurden abzentrifugiert, in 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) resuspendiert, dann siebzehnmals extrudiert und anschließend einmal im gleichen Puffer gewaschen. Eines der Aliquots wurde für das Kontrollexperiment in 1%-Triton-X-100 solubilisiert. Beide Ansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu$ l mit Aminopeptidase aus *Aeromonas proteolytica* sowie Aminopeptidase I aus *Streptomyces griseus* bei 30°C für mehrere Stunden inkubiert, wobei die BetP Konzentration zwischen 0,2 und 0,25 mg/ml lag, das Enzym-Protein-Verhältnis 1:20 000 (w/w) und das Verhältnis der Aktivitäten beider Enzyme 1:1 (je 0,001 Unit/ml) betrug. Der zeitliche Verlauf der proteolytischen Reaktion wurde durch regelmäßige Probennahme (Probenvolumen 10  $\mu$ l  $\approx$  2-2,5  $\mu$ g Protein) verfolgt. Die Reaktion wurde zu gegebenen Zeitpunkten durch Zugabe von Proteaseinhibitor Complete und 1% EDTA gestoppt. Die Proteine wurden elektrophoretisch über SDS-PAGE analysiert. Das BetP-Protein wurde mittels Coomassie-Brilliant-Blaufärbung sichtbar gemacht.

### 2.5.10 Peptide array Experimente

Die Synthese der Peptide auf einer Cellulosemembran erfolgte durch Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc)-Chemie nach Hilpert *et al.*, 2007 und wurde von PD Dr. Joachim Koch (Universität Frankfurt/Main) durchgeführt. Die *peptide array* Experimente wurden nach Koch und Mahler (2002) durchgeführt. Im Interaktions-assay wurde die Membran zunächst über Nacht bei 4°C oder 1-2 h bei RT mit Blockierungspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,6; 150 mM NaCl; 3% Magermilchpulver (Firma Sigma Aldrich, Taufkirchen); 0,05 % Tween 20) blockiert und anschließend für 2 h mit gereinigtem GST-Protein oder GST-C-BetP-Fusionsprotein verdünnt in TBS-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl) inkubiert. Dann wurde die Membran dreimal 10 min in Waschpuffer (TBS, 0,5% Magermilchpulver, 0,05% Tween 20) gewaschen und anschließend 1 h mit dem Anti-GST Antikörper (1:2000 in Waschpuffer, Firma GE-Healthcare, Freiburg) bei RT inkubiert. Es folgten erneut drei Waschschriffe á 10 min (s. o.) bevor 1 h mit dem Zweitantikörper (Anti-Ziege-Peroxidase-Konjugat 1:50 000; Firma Sigma Aldrich, Taufkirchen) inkubiert wurde. Die Entwicklung der Membran erfolgte über die Peroxidasereaktion unter Verwendung des Kits „Uptilight HRP Blot

Chemiluminescent Substrate“ (Firma Uptima Interchim, Montlucon, Frankreich). Die Chemolumineszenz wurde durch eine hochauflösende Kamera (LAS 1000, FujiFilm) nachgewiesen. Zur Regenerierung der Membran wurde zunächst dreimal 10 min in Regenerationslösung A (8 M Harnstoff; 1% SDS; 0,1%  $\beta$ -Mercaptoethanol), dann einmal in  $H_2O_{dd}$  gewaschen. Anschließend wurde dreimal 10 min in Regenerationspuffer B (50% Ethanol; 10% Essigsäure) gewaschen und erneut gewässert, bevor zwei zehnmünütige Waschrötte in 100% DMF (Dimethylformamid) und einer in TFA (Trifluoressigsäure) folgten. Die Waschrötte mit Puffer A und B wurden bei 50°C durchgeführt. Zur Lagerung der Membran bei -20°C wurde diese vor dem Einfrieren schrittweise von  $H_2O_{dd}$  in 100% Ethanol überführt. Zur Reaktivierung wurde dieses Prozedere in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt.

### 2.5.11 Radiochemische Transportmessungen

#### 2.5.11.1 Messungen der Glycinbetainaufnahme in *E. coli* MKH13 Zellen

Zur Messung der BetP-Aktivität in *E. coli*-Zellen wurde LB-Medium (50  $\mu$ g/ml Carbenicillin) mit einer  $\ddot{U}N$ -Kultur auf eine  $OD_{600}$  von 0,15 angeimpft und bei 37°C und 125 Upm bis zu einer  $OD_{600}$  von circa 0,5 geschüttelt. Danach wurde die BetP-Synthese durch Zugabe von AHT (200  $\mu$ g/l) induziert und die Kultur wurde weitere 2 h geschüttelt. Die Zellen wurden einmal gewaschen (25 mM  $KP_i$  (pH 7,5), 100 mM NaCl, 4°C), bevor mit dem gleichen Puffer eine  $OD_{600}$  von circa 2 eingestellt wurde. Für Messungen im nieder-osmolaren Bereich wurde als Waschrötte 15 mM  $KP_i$  und 50 mM NaCl verwendet. Bei schlecht exprimierten *betP*-Mutanten wurde die  $OD_{600}$  auf 6 eingestellt, um die Empfindlichkeitsgrenze der Messung zu erhöhen. Die Zellen wurden mit Glukose energetisiert, so dass die Glukosekonzentration im Messansatz 10 mM betrug. Die Messpuffer setzten sich zusammen aus 25 mM  $KP_i$  und 100 mM NaCl oder 15 mM  $KP_i$  und 50 mM NaCl. Die gewünschte Osmolalität wurde durch weitere Zugabe von NaCl oder KCl eingestellt. Für die Transportmessung wurde 1 ml der Zellen in 1 ml Messpuffer für 3 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Substrataufnahme durch Zugabe von 250  $\mu$ M [ $^{14}C$ ]-Glycinbetain gestartet. Nach 15, 30, 45, 60 und 90 sec wurden jeweils 200  $\mu$ l des Reaktionsansatzes auf Glasfaserfilter (Typ GF5, Schleicher und Schuell, Dassel) über eine Mehrfachfiltrationsanlage abfiltriert. Unmittelbar nach der Filtration wurden die Filter mit zweimal 2,5 ml Waschrötte (0,6 M  $KP_i$ , pH 7,5) gewaschen und mit 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint ecoplus, Roth, Karlsruhe) versetzt. Die

Radioaktivität wurde durch ein  $\beta$ -Strahlen-Zählgerät (Beckman, München) bestimmt. Durch die lineare Auftragung der aufgenommenen Radioaktivität gegen die Zeit konnte mit Hilfe der erhaltenen Steigung die Transportgeschwindigkeit für jede Osmolalität berechnet werden. Die Berechnung der Substrataufnahme erfolgte auf der Grundlage, dass eine OD<sub>600</sub> von 1 einem Zelltrockengewicht von 0,34 mg/ml entspricht.

### **2.5.11.2 Messungen der Glycinbetainaufnahme in *C. glutamicum* DHPF Zellen nach Kultivierung in BHI-Medium**

*C. glutamicum* Zellen wurden abends aus einer Übertagkultur in BHI-Medium mit 20  $\mu$ g/ml Chloramphenicol und 250  $\mu$ M IPTG auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und über Nacht bei 30°C und 125 Upm kultiviert. Das Waschen der Zellen sowie die Aufnahmemessungen erfolgten analog zu den Messungen in *E. coli* (s. 2.5.11.1), außer dass der Reaktionsansatz bei 30°C inkubiert wurde und die Filter mit zweimal 2,5 ml 100 mM LiCl gewaschen wurden. Die Berechnung der Substrataufnahme erfolgte auf der Grundlage, dass eine OD<sub>600</sub> von 1 einem Zelltrockengewicht von 0,36 mg/ml entspricht.

### **2.5.11.3 Messung der Glycinbetainaufnahme in *C. glutamicum* Zellen nach Kultivierung in MMI-Medium in Abhängigkeit der Zeit nach Osmoschock**

Eine BHI-Übernacht-Kultur wurde morgens in kaliumhaltigem MMI-Medium mit 20  $\mu$ g/ml Chloramphenicol auf eine OD von 1 angeimpft. Nach 6 bis 8 Stunden wurden die Zellen im Zielmedium (MMI-Medium mit oder ohne Kalium) bei 30°C dreimal gewaschen und auf eine OD von 1,3 angeimpft. Die plasmid-codierte Expression von *betP* wurde in diesen Kulturen durch Zugabe von 250  $\mu$ M IPTG induziert. Nach Kultivierung über Nacht bei 30°C und 125 Upm wurden die Zellen bei 4°C einmal in 25 mM NaP<sub>i</sub>-Puffer (pH 7,5), 100 mM NaCl gewaschen, bevor mit dem gleichen Puffer eine OD<sub>600</sub> von circa 6 eingestellt wurde. Die Zellen wurden mit Glukose energetisiert, so dass die Glukosekonzentration im Messansatz 10 mM betrug. Vor der Messung wurden die Zellen zunächst ohne Messpuffer für 3 min 30°C vortemperiert. Für die isoosmolaren Messreihen diente als Messpuffer 25 mM NaP<sub>i</sub>-Puffer (pH 7,5), 100 mM NaCl, 500  $\mu$ M [<sup>14</sup>C]-Glycinbetain (Endkonzentration 250  $\mu$ M). Bei Messungen mit dem Stamm  $\Delta cgIK/\Delta kup$  wurden zusätzlich 2,5 mM Ectoin zur Absättigung des EctP-Transporters zugesetzt. Je nach Messansatz wurden kein RbCl oder 5 mM RbCl (Endkonzentration 2,5 mM) zugegeben. Für die hyperosmolare Messreihe wurde die Osmolalität dieses Puffers durch

Zugabe von Sorbitol erhöht, so dass die Osmolalität im Messansatz 1,2 osmol/kg betrug. Die Messung wurde durch Zugabe der Zellen zum Messpuffer gestartet (1:2 Verdünnung). Die Messung wurde unter Rühren bei 30°C durchgeführt. Innerhalb von 5 min wurden 10 Messpunkte in Abständen von 15 sec bis 1 min genommen. Hierzu wurden jeweils 200 µl des Reaktionsansatzes auf Glasfaserfilter (Millipore, Schwalbach) über eine Mehrfachfiltrationsanlage (Hoefer, Pharmacia Biotech) abfiltriert. Unmittelbar nach der Filtration wurden die Filter mit zweimal 2,5 ml Waschlösung (0,1 M KCl, pH 7,5) gewaschen und mit 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint ecoplus, Roth, Karlsruhe) versetzt. Die Radioaktivität wurde durch ein  $\beta$ -Strahlen-Zählgerät (Beckman, München) bestimmt. Die aufgenommene Radioaktivität wurde gegen die Zeit aufgetragen (gemittelte Werte aus drei Messungen) und aus der Differenz zwischen zwei Zeitpunkten wurde auf Grund der eingesetzten spezifischen Radioaktivität und dem für jede Kultur ermittelten Umrechnungsfaktor von optischer Dichte in Biotrockenmasse die BetP-Rate für verschiedene Zeitpunkte bestimmt.

#### **2.5.11.4 Messung der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in *C. glutamicum* Zellen nach Kultivierung in MMI-Medium in Abhängigkeit der Zeit nach Osmoschock**

Die Anzucht und Vorbereitung der Zellen erfolgte wie unter Punkt 2.5.11.3 beschrieben. Die Messpuffer setzten sich ebenfalls wie unter Punkt 2.5.11.3 beschrieben zusammen, mit dem Unterschied, dass stets  $^{86}\text{RbCl}$  (Endkonzentration 2,5 mM) und kaltes Glycinbetain verwendet wurden. Innerhalb von 8 min wurden 10 Messpunkte in Abständen von 15 sec bis 2 min genommen. Hierzu wurden jeweils 200 µl des Reaktionsansatzes auf Glasfaserfilter (Millipore, Schwalbach) über eine Mehrfachfiltrationsanlage (Hoefer, Pharmacia Biotech) abfiltriert. Unmittelbar nach der Filtration wurden die Filter mit zweimal 2,5 ml mit 0,1 M KCl, pH 7,5 gewaschen und mit 3,8 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  versetzt. Die Radioaktivität wurde durch ein  $\beta$ -Strahlen-Zählgerät (Beckman, München) bestimmt. Die aufgenommenen Radioaktivitäten (gemittelte Werte aus drei Messungen) wurden mit der Funktion  $y=ax/b+x$  gefittet und auf Grundlage der bekannten spezifischen Aktivität sowie denen für jede Kultur ermittelten BTM-Umrechnungsfaktoren in die zu einem Zeitpunkt aufgenommene Rubidiummenge umgerechnet. Hieraus wurde mit dem Innenvolumenumrechnungsfaktor von 1,6 µl/mg BTM und den flammphotometrisch bestimmten internen  $\text{K}^+$ -Anfangskonzentrationen auf die interne  $\text{Rb}^+/\text{K}^+$ -Konzentration, welche sich im Experiment aus  $[\text{K}]^+ + [^{86}\text{Rb}^+]$  zusammensetzte, zu jedem Zeitpunkt geschlossen.

### 2.5.11.5 Messungen der Glycinbetainaufnahme in Proteoliposomen

Ein Aliquot Proteoliposomen wurde aufgetaut und mit 100 mM  $KP_i$ , pH 7,5 auf ein Volumen von 1000  $\mu$ l aufgefüllt, siebzehnmal extrudiert und zentrifugiert (353.000g, 20 min, 20°C). Die Proteoliposomen wurden dann in einem geringen Volumen resuspendiert und zur Transportmessung eingesetzt. Proteoliposomen mit internem Peptidüberschuss wurden wie unter Punkt 2.5.8 beschrieben für die Transportmessungen vorbereitet. Zur Messung der Transportaktivität von BetP wurde ein externer Puffer mit 20 mM NaPi (pH 7,5), 25 mM NaCl verwendet. Die jeweilige Osmolalität wurde, wenn nicht anders angegeben, durch Zugabe von Prolin zum externen Puffer eingestellt. Zur Transportmessung wurden 500  $\mu$ l externen Puffer 15  $\mu$ M [ $^{14}$ C]-Glycinbetain und 1  $\mu$ M Valinomycin zugesetzt. Zum Starten der Reaktion wurden 2,5  $\mu$ l Proteoliposomen hinzugefügt. Jeweils 200  $\mu$ l des Ansatzes wurden nach 5 und 10 sec abgenommen, auf einen Zellulose-Mischester-Filter (0,45  $\mu$ m Porengröße, Millipore, Schwalbach) gegeben und mit Hilfe einer Mehrfachfiltrationsanlage (Hofer, Pharmacia Biotech) gefiltert. Der Filter, auf dem die Proteoliposomen adsorbiert wurden, wurde unmittelbar nach Zugabe der Messprobe mit 2,5 ml 100 mM LiCl oder isoosmolar mit dem entsprechenden Schockpuffer gewaschen und mit 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit inkubiert. Die Radioaktivität wurde in einem  $\beta$ -Strahlen-Zählgerät (Beckman, München) bestimmt. Der Differenzwert der Radioaktivität zwischen der 5-Sekunden- und 10-Sekundenprobe wurde auf die Aufnahme pro Minute extrapoliert und mit Hilfe der bekannten spezifischen Aktivität und der eingesetzten Proteinmenge in die Einheit nmol/min\*mg Protein umgerechnet.

## 2.6 Biophysikalische Methode:

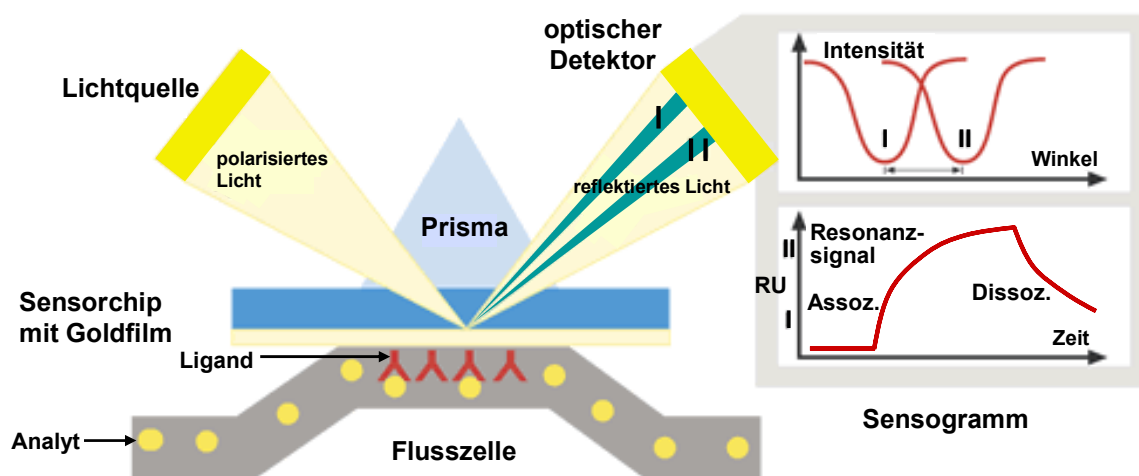
### ***Surface-plasmon-resonance-Spektroskopie***

#### 2.6.1 Theoretische Grundlagen

Die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (*surface-plasmon-resonance*-(SPR)-Spektroskopie) ist eine biophysikalische *in vitro* Methode, mit der Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Molekülen (zum Beispiel Protein-Lipid, Protein-Protein, Protein-DNA) in Echtzeit erfasst und quantitativ charakterisiert werden können. Das Prinzip der SPR-Spektroskopie ist in Abbildung 2.1 skizziert. Ein Interaktionspartner (Ligand) wird über eine Dextranmatrix auf der dünnen Goldschicht eines Sensorchips immobilisiert. Der



zweite Interaktionspartner (Analyt) fließt durch eine Flusszelle kontinuierlich hieran vorbei. Auf der Rückseite des Chips fällt monochromatisches, polarisiertes Licht durch ein Glasprisma im Winkel der Totalreflexion ein. Hierbei hat die Glasschicht des Chips einen hohen Brechungsindex und die Flüssigkeit über dem Sensorchip (oberflächennahe Schicht) einen niedrigeren. An der Grenzfläche zwischen Glas und Gold verursacht das elektromagnetische Feld des einfallenden Lichtes ein evaneszentes Feld. Dieses breitet sich wenige Nanometer in die Goldschicht hinein aus und bringt hier die Elektronen dieser in Schwingung, wodurch das sogenannte Oberflächenplasmon erzeugt wird. Die Energie, die bei der Entstehung des Oberflächenplasmons absorbiert wird, vermindert in der Position eines bestimmten Winkels die Intensität des reflektierten Lichtes. Dieser Winkel heißt Resonanzwinkel. Kommt es zu einer Massenveränderung auf der Goldschicht - dies ist der Fall bei der Kopplung des Liganden oder bei einer Ligand-Analyt Wechselwirkung - so verändert sich der Brechungsindex der oberflächennahen Schicht und damit auch der Resonanzwinkel. Die Änderung des Resonanzwinkels wird detektiert und ist direkt proportional zur Massenveränderung auf dem Chip (Biacore, 1994).



**Abbildung 2.1: Messprinzip eines SPR-Spektrometers.** (modifiziert nach: [www.rci.rutgers.edu/~longhu/Biacore/MolecularInteractionAnalysis.html](http://www.rci.rutgers.edu/~longhu/Biacore/MolecularInteractionAnalysis.html)). Durch die Oberflächenplasmonresonanz der Goldschicht entsteht ein Intensitätsabfall im reflektierten Licht. Wenn der Analyt an den Liganden bindet, verändert sich der Winkel des Schattens im reflektierten Licht. Diese Winkeländerung ist proportional zur Masse des gebundenen Analyten und wird im Sensorgramm aufgezeichnet.

In einem Interaktionsexperiment wird die Änderung des Resonanzwinkels in *response units* (RU) (relative Einheiten) gegen die Zeit aufgetragen. Das erhaltene Diagramm heißt

Sensorgramm. Hier können die drei Phasen eines Interaktionsexperimentes abgelesen werden:

- 1) Assoziationsphase: Der Analyt fließt in konstanter Konzentration und mit konstanter Geschwindigkeit über die Sensoroberfläche. Die Bindung des Analyten resultiert hierbei in der Zunahme des RU-Wertes. Bindung und Freisetzung des Analyten passieren zeitgleich, die Amplitude des detektierten Signals beschreibt aber nur die Nettozunahme an Analyten auf der Oberfläche. Die Amplitude bleibt konstant, wenn das System ins Gleichgewicht kommt und Bindung und Freisetzung des Analyten gleich schnell sind.
- 2) Dissoziationsphase: Die Flusszelle wird nur mit Puffer gespült. Die gebundenen Analytmoleküle dissoziieren vom Liganden und werden weggespült. Der RU-Wert sinkt ab.
- 3) Regenerationsphase: Die Zeitspanne bis zur komplett abgeschlossenen Dissoziation wird verkürzt, indem die restlichen, gebundenen Analytmoleküle durch eine Regenerationslösung (zum Beispiel eine Säure oder Base) abgewaschen werden. Der Ausgangs-RU-Wert wird wieder erreicht.

In der vorliegenden Arbeit wurden SPR-Messungen zur Untersuchung von Protein-Lipid-Interaktionen mit dem Gerät Biacore-3000 durchgeführt. Dieses Gerät verfügt über vier serielle Flusszellen, so dass vier verschiedene Liganden auf den Sensorchip gekoppelt und alle Liganden durch eine Analytinjektion erreicht werden können (Biacore, 1994).

### 2.6.2 Kinetische Zusammenhänge und Datenauswertung

Eine einfache Interaktion von Analyt (A) und Ligand (B) zum Analyt-Liganden-Komplex (AB) kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:



Hierbei sind  $k_a$  [ $M^{-1} \cdot s^{-1}$ ] und  $k_d$  [ $s^{-1}$ ] die Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation beziehungsweise die Dissoziation.

Unterteilt man die Gleichung in Hin- und Rückreaktion so gilt:

$$-d [AB]/dt = k_d [AB] \quad (\text{Zerfall}) \quad (\text{Gleichung 2.2})$$

und

$$d[AB]/dt = k_a [A] [B] \quad (\text{Bildung}) \quad (\text{Gleichung 2.3})$$

Die Zerfallsgeschwindigkeit des AB-Komplexes hängt von der Dissoziationskonstanten sowie von der Konzentration des [AB]-Komplexes ab. Die Geschwindigkeit, mit der der Komplex gebildet wird, hängt von der Assoziationskonstanten sowie von der Konzentration der freien Interaktionspartner ab. In der Assoziationsphase ist die Bildungsgeschwindigkeit des AB Komplexes von Bildungs- und Zerfallsreaktion beeinflusst. Aus Gleichung 2.2 und 2.3 erhält man:

$$d[AB]/dt = k_a [A] [B] - k_d [AB] \quad (\text{Gleichung 2.4})$$

In der Dissoziationsphase findet nur Komplexzerfall und keine Komplexbildung statt. Hier gilt also nach Gleichung 2.2 für die Bildungsgeschwindigkeit des Komplexes [AB]:

$$d [AB]/dt = -k_d [AB] \quad (\text{Gleichung 2.5})$$

Kommt die Reaktion Gleichgewicht, so bleibt die Konzentration des AB-Komplexes konstant, Zerfallsrate und Bindungsrate sind gleich schnell und es gilt nach Gleichung 2.4:

$$d[AB]/dt = 0 \quad \text{und somit} \quad 0 = k_a [A] [B] - k_d [AB] \quad (\text{Gleichung 2.6})$$

Die Geschwindigkeitskonstanten  $k_a$  und  $k_d$  können direkt aus einem Sensorgramm berechnet und zur quantitativen Beschreibung einer Bindung verwendet werden, häufig wird aber auch die Dissoziationskonstante  $K_d [M^{-1}]$  als Maß für die Affinität einer Bindung angegeben. Es gilt:

$$K_d = k_d/k_a \quad (\text{Gleichung 2.7})$$

Durch Einsetzen in Gleichung 2.6 ergibt sich:

$$K_d = ([A] * [B]) / [AB] \quad (\text{Gleichung 2.8})$$

Der  $K_d$ -Wert gibt also den Anteil freier Bindungspartner im Gleichgewicht an. Das heißt, je größer der Wert ist, desto geringer ist die Affinität zwischen Analyt und Ligand.

Das in der SPR-Spektroskopie detektierte Signal RU kann wie folgt in Gleichung 2.6 eingesetzt werden:

$[A] = C$  (Konzentration des Analyten im Experiment, bleibt konstant)

$[AB] = RU$  (Signal durch gebildeten Komplex)

$[B] = RU_{\max} - RU$  (Amplitude bei vollständiger Ligandenbelegung ( $RU_{\max}$ ) abzüglich aktuell belegter Liganden (RU) ergibt Anzahl an freiem Liganden).

Dadurch ergibt sich aus Gleichung 2.6:

$$0 = k_a C * (RU_{\max} - RU) - k_d * RU \quad \text{(Gleichung 2.9)}$$

Entspricht die eingesetzte Konzentration C dem  $K_d$  Wert, so kann in dieser Gleichung  $C = K_d = k_d / k_a$  eingesetzt werden und durch Umformung erhält man:

$$K_d = 1/2 RU_{\max} \quad \text{(Gleichung 2.10)}$$

Das heißt, im Gleichgewicht entspricht der  $K_d$  Wert der Analytkonzentration, bei welcher der halbmaximale RU Wert erreicht wird. Auf Grund dieses Zusammenhangs kann ein Näherungswert für den  $K_d$ -Wert bestimmt werden, indem die RU-Werte im Gleichgewicht gegen verschiedene Analytkonzentrationen aufgetragen werden. In der resultierenden Sättigungskurve kann der  $K_d$ -Wert dann als Proteinkonzentration des halbmaximalen RU-Wertes abgelesen werden. Diese Auswertungsmethode heißt Gleichgewichts-Affinitäts-Analyse und wurde in dieser Arbeit zur Datenauswertung benutzt (Biacore, 1997).

### 2.6.3 Kopplung von Liposomen auf einen L1-Chip und Durchführung von Interaktionsexperimenten

Auf einen L1-Chip (Firma Biacore) können Lipide in Form von Liposomen über lipophile Anker in der Dextranmatrix des Chips gekoppelt werden. Laut Herstellerangaben fusionieren die Liposomen auf dem Chip zu einem geschlossenen *bilayer*. In der Literatur gibt es diesbezüglich jedoch widersprüchliche Angaben, da häufig elektronenmikroskopische Analysen belegten, dass die einzelnen, dicht gepackten Lipidvesikel auf dem Chip erhalten bleiben (Erb *et al.*, 2000; Cooper *et al.*, 2000).

*E. coli* Lipide sowie synthetischen Lipide (DOPE/DOPC), die wie unter Punkt 2.5.7 beschrieben mit 33% und 66% DOPG dotiert worden waren, wurden durch einen Polycarbonatfilter mit einer Porengröße von 100 nm siebzehnmal extrudiert und auf eine Konzentration von 0,33 mg/ml Lipid verdünnt. Für eine Kopplung wurden jeweils 25 µl der Liposomensuspension mit einer Flussrate von 5 µl/min in das Biacore-3000-System injiziert. Als Kopplungspuffer sowie interner Liposomenpuffer dienten 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM KCl. Nach der Kopplung wurde locker gebundenes Lipid durch zwei Waschschrte mit 50 mM NaOH (5 µl, 10 µl/min) entfernt.

Zur Durchführung eines Interaktionsexperimentes wurden Analytproben (Probenvolumen 30 µl) unterschiedlicher Proteinkonzentrationen mit einer Rate von 30 µl/min in das System injiziert. Die Assoziationszeit von 60 sec wurde benötigt, um die Interaktionsreaktion ins Gleichgewicht zu bringen. Die Dissoziationszeit betrug 120 sec. Um „Puffersprungsignale“ zu vermeiden, war es wichtig, dass der Puffer in dem das Protein vorlag, absolut identisch war zum Laufpuffer im Biacore-System (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM KCl). Auf Grund unvollständiger Dissoziation wurde nach jeder Interaktionsmessung die Liposomenoberfläche mit dem Detegenz CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat, 20 mM) vollständig vom Chip abgewaschen und wie oben beschrieben neu aufgezogen.

### 3 Ergebnisse

Objekt dieser Arbeit ist der osmoregulierter Glycinbetain-Transporter BetP aus *C. glutamicum*, der neben seiner katalytischen Aktivität auch Sensor- und Regulatorfunktion besitzt (Rübenhagen *et al.*, 2000). In Proteoliposomen wurde die interne Kaliumkonzentration als der von BetP zur Aktivierung detektierte Stimulus identifiziert (Rübenhagen *et al.*, 2001). An Hand C-terminal verkürzter BetP-Varianten konnte eine essentielle Funktion der C-terminalen BetP-Extension bei der Kaliumsensorik und Aktivitätsregulation von BetP nachgewiesen werden (Peter *et al.*, 1998a; Schiller *et al.*, 2004a,b). Des Weiteren war bekannt, dass die BetP-Regulation von der Kopfgruppenzusammensetzung der Membran beeinflusst wird (Schiller, 2004). In dieser Arbeit wurde die Funktion der C-terminalen Domäne im BetP-Regulationsmechanismus näher charakterisiert. Dies geschah zum einen durch ortsgerichtete Mutagenese innerhalb der C-Domäne und zum anderen durch die biochemische und biophysikalische Charakterisierung C-terminaler Interaktionen mit anderen Proteinbereichen sowie mit Lipiden. In diesem Zusammenhang wurde auch die weitestgehend unbekannt Funktion der N-terminalen BetP-Extension analysiert. Im letzten Teil der Arbeit wurde die Bedeutung von Kalium für die Aktivierung des Transporters *in vivo* untersucht, welche bislang nur *in vitro* belegt war.

#### 3.1 Ortsgerichtete Mutagenese der C-terminalen Domäne

Die cytoplasmatisch gelegene C-terminale Extension von BetP umfasst die Aminosäurereste 546-595. Wird dieser Proteinbereich um 25 Aminosäuren verkürzt oder ganz deletiert, so verliert der Transporter die Fähigkeit seine Aktivität in Abhängigkeit des Kaliumreizes zu regulieren. Daraus wurde geschlossen, dass die C-Domäne direkt in die Kaliumsensorik involviert ist. Eine direkte Kaliumbindestelle konnte aber bislang nicht identifiziert werden. *In silico* Strukturanalysen sagen für die Reste 553-586 beziehungsweise 592 eine  $\alpha$ -Helix vorher (s. Anhang 6.3). Die  $\alpha$ -helikale Struktur wurde inzwischen auch röntgenkristallographisch nachgewiesen. Laut vorläufigen Strukturdaten umfasst die Helix in etwa die Reste 550-590 (Susanne Ressler, persönliche Mitteilung). Im Vorfeld dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Einführung des Helixbrechers Prolin

in der Mitte der  $\alpha$ -Helix (E572) sowie im vorderen Bereich der Helix (Y550) zum Verlust der Osmoregulation des Transporters führten (Schiller *et al.*, 2006). Es wurde geschlussfolgert, dass die Deregulation durch eine veränderte Konformation der Domäne ausgelöst wird. In dieser Arbeit wurde eine ausführliche Prolin-scanning-Mutagenese innerhalb der C-Extension durchgeführt, um die Bedeutung der  $\alpha$ -Helix für die BetP-Regulation im Detail zu untersuchen. Es war denkbar, dass je nach Lage des eingeführten Prolins in der Helixwindung eine periodische Wiederholung von Effekten auftreten könnte. Zur Kontrolle wurden in ausgewählten Positionen auch andere Aminosäurereste eingeführt, welche die  $\alpha$ -helikale Struktur nicht stören sollten (im Folgenden zusammenfassend als „Nicht-Prolinsubstitutionen/-varianten“ bezeichnet) (Sekundärstrukturvorhersagen und *helical wheel* Vorhersage, siehe Anhang 6.3, 6.4). Abbildung 3.1 gibt einen schematischen Überblick über die vorgenommenen Substitutionen.

550	560	570	580	590
NDVIYLE	YREQQRFNARLARERRVHNEHRKRELA	AAKRRRER	KASGAGKRR	
	P P	PPPPPPP	PPP P P P	
550 A	555 A/R	558 A/D	564 K/D	568 A/D
			576 A/E	

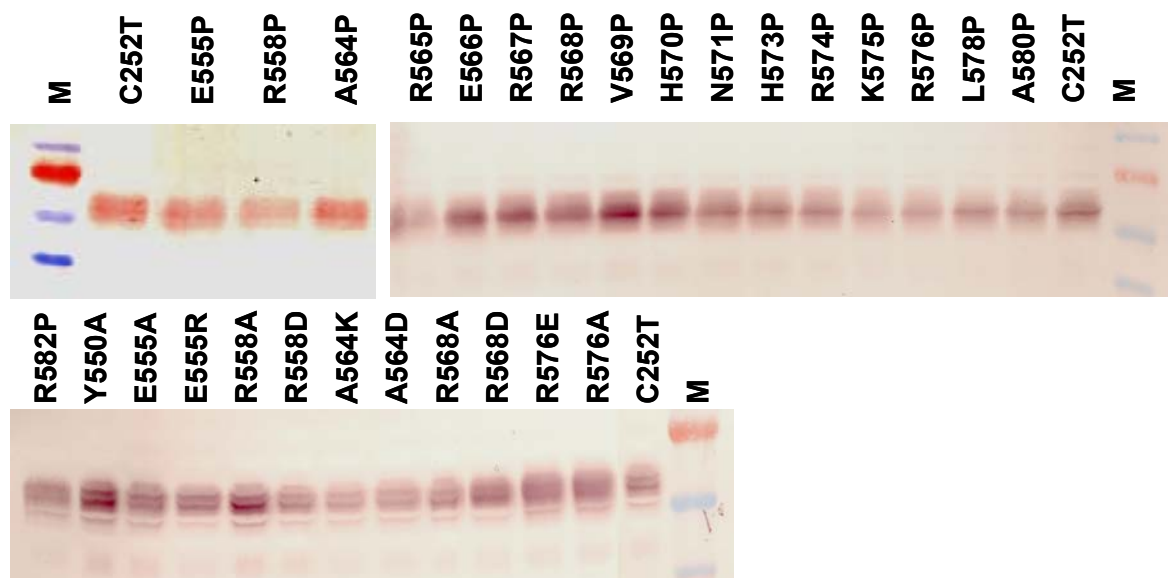
**Abbildung 3.1: Schematische Übersicht der konstruierten C-terminalen BetP-Varianten.** Oben: Aminosäuresequenz der C-terminalen Domäne. Der mit dem Programm 3DPSSM vorhergesagte  $\alpha$ -helikale Bereich ist blau unterlegt. Mitte: Position der Prolinsubstitutionen. Unten: Positionen der Nicht-Prolinsubstitutionen. Blaue Buchstaben kennzeichnen die Substitutionen der BetP-Varianten, welche sowohl in *E. coli* als auch in *C. glutamicum* charakterisiert wurden.

Die *betP*-Mutanten wurden auf Plasmiden durch ortsgerichtete Mutagenese konstruiert, wobei als Plasmidhintergrund pASK-IBA5-*betP* oder pXMJ19-*betP* verwendet wurde. Als Grundlage für alle BetP-Varianten diente das BetP-Protein C252T, in welchem das einzige Cystein des Transporters ausgetauscht ist. Dieses besitzt die gleichen regulatorischen Eigenschaften wie das Wildtypprotein. Die Verwendung dieser cysteinfreien BetP-Variante als Hintergrund eröffnet im Rahmen anderer Arbeiten die Option, an strategisch günstigen Positionen gezielt Cysteine einzuführen, welche für biophysikalische Untersuchungen mit Fluoreszenz- oder Elektronen-*spin-labeln* markiert werden können.

Die Charakterisierung der BetP-Varianten erfolgte in *E. coli* MKH13 Zellen und in *C. glutamicum* DHPF Zellen. In diesen Stämmen sind die Gene für Transporter kompatibler Solute deletiert (*E. coli* MKH13:  $\Delta putPA$ ,  $\Delta proP$ ,  $\Delta proU$ ; *C. glutamicum* DHPF:  $\Delta betP$ ,  $\Delta proP$ ,  $\Delta putP$ ,  $\Delta ectP$ ,  $\Delta lcoP$ ). *E. coli* und *C. glutamicum* können auf Grund ihrer

unterschiedlichen Membranzusammensetzung als *screening*-Systeme für den Einfluss der Membranumgebung auf das Regulationsverhalten von BetP eingesetzt werden.

A



B



**Abbildung 3.2: Western Blot Analyse der Synthese von BetP C252T und C-terminalen BetP-Varianten.** Für den Western Blot erfolgte die Zellanzucht und Induktion in gleicher Weise wie für die Transportmessungen. Isolierte Membranen wurden über SDS-PAGE (12,5%) nach Laemmli getrennt. Die BetP Proteine wurden durch polyklonale Antikörper gegen BetP nachgewiesen. C252T: Positivkontrolle (Sollgröße: 64,2 kDa). M: Proteinmarker; Molekulargewichte der Markerbanden von oben nach unten, beginnend mit der roten Bande (Angaben in kDa): 72, 55, 40. **(A) *E. coli* MKH13 Stämme.** Es wurden jeweils 10 µg (linkes Teilbild) beziehungsweise 40 µg Gesamtprotein (rechtes und unteres Teilbild) eingesetzt. Es konnten zur C252T Kontrolle vergleichbare Mengen nachgewiesen werden. Leichte Schwankungen konnten mit leichten Schwankungen in der Gesamtproteinmenge in gegengefärbten Polyacrylamidgelen belegt werden. **(B) *C. glutamicum* DHPF Stämme.** Es wurden je 40 µg Gesamtprotein eingesetzt. Alle BetP-Varianten konnten nachgewiesen werden. Die BetP-Mengen waren vergleichbar zur C252T Kontrolle.



### 3.1.1 Immunologische Quantifizierung C-terminaler BetP-Varianten

Für die Überexpression der *betP*-Mutanten in *E. coli* wurde der Expressionsvektor pASK-IBA5 verwendet, in dem das *betP*-Gen unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren *tet*-Promotors steht. Die Überexpression in *C. glutamicum* erfolgte mit Hilfe des Vektors pXMJ19. Hier steht das *betP* Gen unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors. Um sicherzustellen, dass eventuelle Unterschiede in der Transportaktivität nicht auf unterschiedlichen Expressionsstärken beruhen, wurde die Synthesemenge der BetP-Varianten immunologisch nachgewiesen. Hierzu erfolgte die Zellanzucht und Induktion in gleicher Weise wie für Transportmessungen. Nach Aufschluss der Zellen wurde eine Membranpräparation durchgeführt und jeweils gleiche Proteinmengen wurden über SDS-PAGE getrennt. Der Nachweis von BetP erfolgte durch BetP-spezifische Antikörper.

Für alle BetP-Varianten konnten zur C252T Kontrolle vergleichbare BetP-Proteinmengen (64,2 kDa) als deutliche Bande zwischen den Höhen der Markerbanden von 72 und 55 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 3.2). Zwar traten in wenigen Fällen etwas stärkere Banden auf, anhand der zugehörigen Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten Polyacrylamidgelen war jedoch ersichtlich, dass diese durch leichte Schwankungen in den aufgetragenen Gesamtproteinmengen verursacht worden waren (Daten nicht gezeigt). Durch die Western Blot Analysen konnte also ausgeschlossen werden, dass größere Unterschiede in der Transportaktivität der BetP-Varianten durch unterschiedlich starke Proteinsynthese beziehungsweise unterschiedlich effizienten Einbau von BetP in die Cytoplasmamembran verursacht wurden.

### 3.1.2 Aktivitätsregulation C-terminaler BetP-Prolinvarianten in *E. coli*

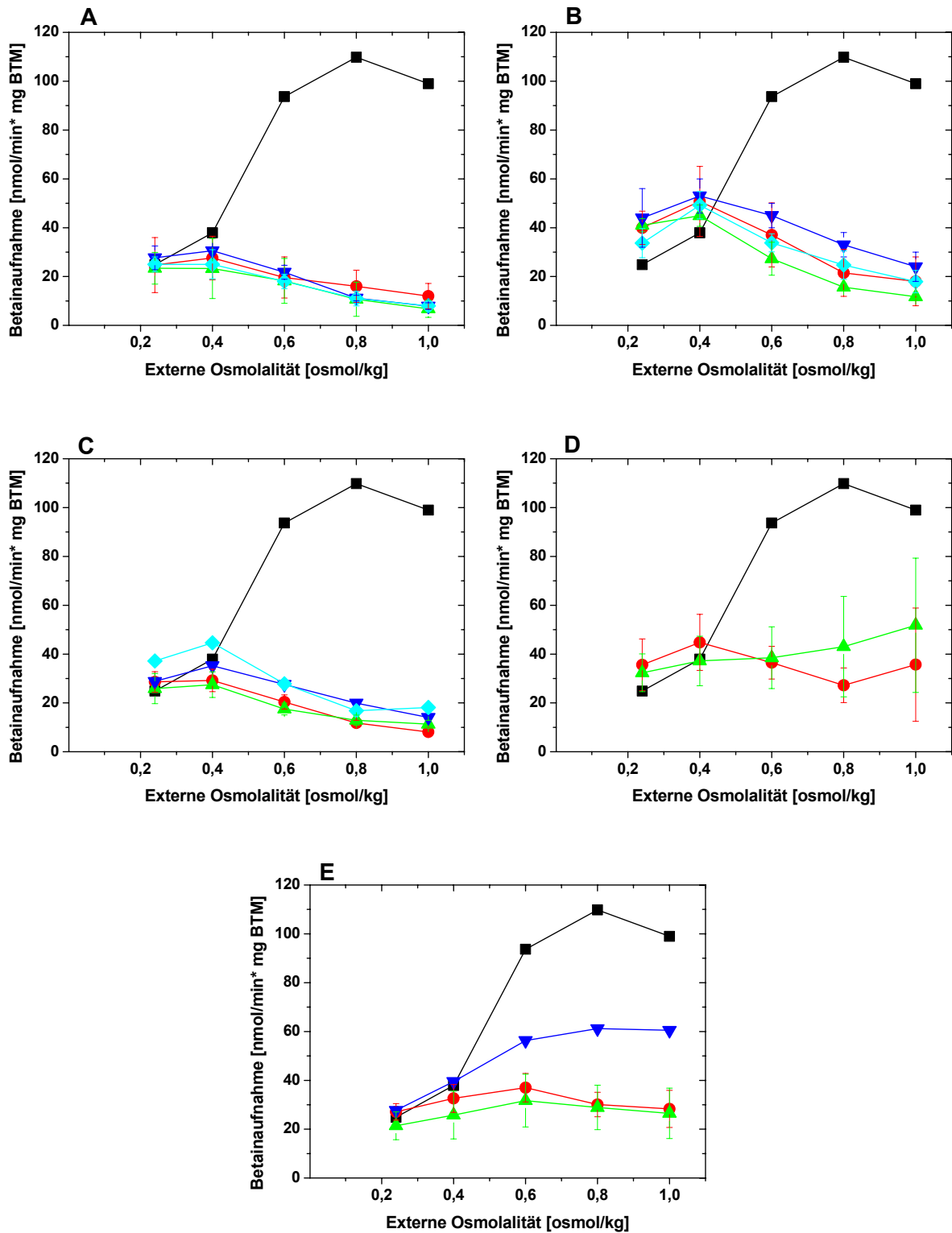
#### MKH13 Zellen

Zunächst wurden die BetP-Prolinvarianten in *E. coli* MKH13 Zellen charakterisiert. Hierzu wurde die Betainaufnahme in Abhängigkeit der externen Osmolalität bestimmt. Die Ergebnisse aus diesen Messungen sind in Abbildung 3.3 gezeigt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus mindestens drei Messungen mit der zugehörigen Standardabweichung beziehungsweise eine repräsentative Einzelmessung, wenn der Fehler weniger als 10% vom Mittelwert betrug.

Die Kontrolle BetP C252T zeigt die typische BetP-Aktivierungskurve mit sigmoidalem Kurvenverlauf und einem Aktivitätsoptimum von 110 nmol/min \* mg BTM bei 0,8 osmol/kg. Die Einführung eines Prolins im Bereich der Aminosäurereste E555-R582

fürte in allen Fällen zu aktiven BetP-Varianten, deren Regulationsverhalten sich jedoch von BetP C252T unterschied. Prolinvarianten mit Substitutionen zwischen den Resten E555 und K575 waren nicht osmotisch reguliert, sie konnten ihre Transportaktivität nicht mehr dem applizierten osmotischen Stress anpassen (Abbildung 3.3A-C). Die Varianten BetP E555P, R558P, A564P, R565P, H570P, N571P sowie H573P zeigten bei 0,24 osmol/kg Basisaktivitäten zwischen 20 und 30 nmol/min \* mg BTM vergleichbar zur Basisaktivität der BetP C252T Kontrolle. Zwischen 0,24 und 0,4 osmol/kg blieb die Transportaktivität entweder konstant (R558P, R565P, H570P) oder zeigte einen marginalen Anstieg (Varianten E555P, A564P, N571P, H573P). Mit steigender Osmolalität war in allen Fällen ein Absinken der BetP-Aktivität auf bis circa 10 bis 15 nmol/min \* mg BTM bei 1,0 osmol/kg zu verzeichnen (Abbildung 3.3A, B). Ein ähnlich verändertes Aktivitätsprofil zeigten die BetP-Derivate E566P bis V569P sowie R574P und K575P (Abbildung 3.3B, C). Hier waren jedoch die Basisaktivitäten mit etwa 35 bis 45 nmol/min \* mg BTM im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht und der Anstieg bei externen Osmolalitäten zwischen 0,24 und 0,4 osmol/kg etwas stärker ausgeprägt als bei den zuvor beschriebenen BetP-Varianten. Bei höheren Osmolalitäten sanken die Raten hier auf Werte zwischen 10 nmol/min \* mg BTM (R567P) und 25 nmol/min \* mg BTM (R568P) ab. Die BetP-Variante R576P (Abbildung 3.3D) zeigte einen schwachen aber linearen Anstieg der Transportaktivität von 30 nmol/min \* mg BTM auf 45 nmol/min \* mg BTM im Bereich externer Osmolalitäten von 0,24 bis 1,0 osmol/kg. Diese konnte also als schwach reguliert bezeichnet werden. Ebenfalls sehr schwach reguliert waren die hierauf in *downstream* Richtung folgenden BetP-Varianten L578P sowie A580P. Ausgehend von einer zur Kontrolle ähnlichen Basisaktivität von circa 20 nmol/min \* mg BTM stieg hier die Transportrate bis zu einer externen Osmolalität von 0,6 osmol/kg leicht an und sank dann wieder leicht ab, wobei der Endwert bei 1,0 osmol/kg leicht über der Basisaktivität lag (BetP A580P) oder gleich hoch wie diese ausfiel (BetP L578P). Die BetP-Variante R582P war osmotisch reguliert (Abbildung 3.3D). Sie zeigte einen deutlichen Anstieg der Transportrate in Abhängigkeit des osmotischen Stresses. Die Basisaktivität ist mit knapp 30 nmol/min \* mg BTM ähnlich wie bei der Kontrolle. Die maximale Aktivität wurde, wie bei BetP C252T, bei 0,8 osmol/kg erreicht. Allerdings blieb die Rate mit annähernd 60 nmol/min \* mg BTM um circa 50% unter der maximalen Aktivität von BetP C252T.

Insgesamt zeigten die in *E. coli* MKH13 Zellen ermittelten Daten, dass der Helixbrecher Prolin im vorderen und mittleren Bereich der C-terminalen  $\alpha$ -Helix (E555P–K575P) zum Verlust der Osmoregulation führte. Je weiter die Prolinsubstitution in den hinteren Bereich der  $\alpha$ -Helix rückte, desto weniger wurde die BetP-Regulation gestört. So waren BetP R576P-R580P schwach und BetP R582P signifikant osmoreguliert.



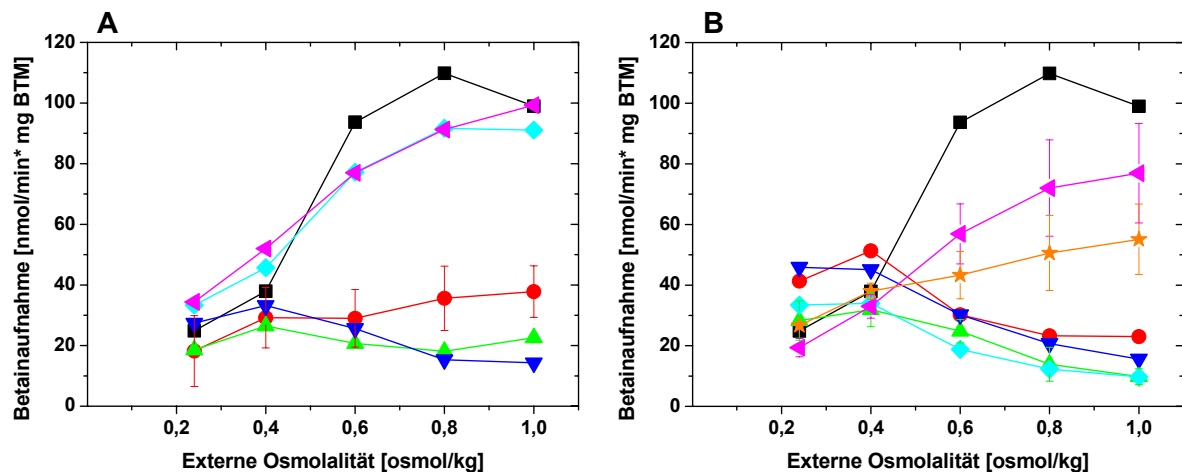
**Abbildung 3.3: Transportaktivität von BetP C252T und C-terminaler Prolinvarianten in Abhängigkeit der externen Osmolalität in *E. coli* MKH13.** Externer Puffer: 25 mM  $KP_i$ , pH 7,5; 100 mM NaCl. Die Aufnahmemessung wurde durch Zugabe von 250  $\mu$ M [ $^{14}$ C]-Glycinbetain gestartet. Die Osmolalitäten wurden mit KCl eingestellt. Die Aufnahmeaktivitäten folgender Stämme sind gezeigt: C252T Kontrolle ■. (A) E555P●; R558P▲; A564P▼; R565P◆. (B) E566P●; R567P▲; R568P▼; V569P◆. (C) H570P●; N571P▲; H573P▼; R574P◆. (D) K575P●; R576P▲. (E) L578P●; A580P▲; R582P▼.

### 3.1.3 Aktivitätsregulation C-terminaler BetP-Varianten mit Nicht-Prolinsubstitutionen in *E. coli* MKH13

Die Ergebnisse aus der Charakterisierung C-terminaler Prolinvarianten ließen den Schluss zu, dass die beobachteten Regulationsdefekte mit einer konformationellen Störung der C-terminalen  $\alpha$ -Helix zusammenhängen. Im nächsten Schritt wurde nun durch Umkehrung und Eliminierung von Ladungen (E555A/R, R558A/D, R568A/D, R576A/E) beziehungsweise Einführung von Ladungen (A564K/D) sowie einer neutralen Substitution (Y550A) in einzelnen Positionen überprüft, in welcher Weise Austausch, die laut *in silico* Vorhersage keinen Einfluss auf die helikale Struktur der C-Extension haben sollten, die BetP-Regulation beeinflussen können (Sekundärstrukturvorhersagen, siehe Anhang 6.3). Die ausgewählten Positionen konzentrierten sich auf den vorderen und mittleren Bereich der C-Domäne, da im Abschnitt der letzten 25 C-terminalen Aminosäuren in früheren Mutagenesestudien bereits ein *triple-alanin-scanning* durchgeführt worden war, welches gezeigt hatte, dass Aminosäuresubstitutionen in diesem hinteren Bereich der C-Domäne keinen Einfluss auf die BetP-Regulation haben (Schiller, 2004). Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen mit diesen BetP-Varianten in *E. coli* MKH13 Zellen sind in Abbildung 3.4 dargestellt. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte aus mindestens drei Messungen mit der zugehörigen Standardabweichung beziehungsweise eine repräsentative Einzelmessung, wenn der Fehler weniger als 10% vom Mittelwert betrug.

Die BetP-Variante Y550A war schwach osmotisch reguliert und zeigte eine lineare Zunahme der Betainaufnahme von 15 auf 30 nmol/min \* mg BTM bei Steigerung der externen Osmolalität von 0,24 auf 1,0 osmol/kg. Die zugehörige Prolinvariante Y550P war hingegen nicht reguliert (Schiller *et al.*, 2006; Ott, 2005). Eine Ladungsumkehrung beziehungsweise Eliminierung in der Position E555 (E555R, E555A) verursachte einen Verlust der Osmoregulation in ähnlicher Weise wie die Einführung eines Prolins in dieser Position (Abbildung 3.4A). Mit Basisaktivitäten vergleichbar zur Kontrolle war zwischen 0,24 und 0,4 osmol/kg ein leichter Anstieg der Aktivität zu verzeichnen. Bei höheren Osmolalitäten nahm die BetP-Transportrate wieder leicht ab. Der gleiche Kurvenverlauf wurde für die Varianten A564D, A564K, R568A und R568D beobachtet, wobei die absoluten Raten für A564D und R568A etwas höher ausfielen als bei den übrigen BetP-Derivaten (Abbildung 3.4B). Auch in den Positionen A564 und R568 hatten also die Substitutionen, welche die  $\alpha$ -helikale Struktur der C-Domäne nicht stören sollten, den gleichen Effekt wie der Helixbrecher Prolin. Eine Ausnahme hierzu stellte die Position 558 im vorderen Bereich der putativen  $\alpha$ -Helix dar. Hier waren die Varianten R558A und R558D - anders als BetP R558P - voll osmotisch reguliert (Abbildung 3.4A). Die

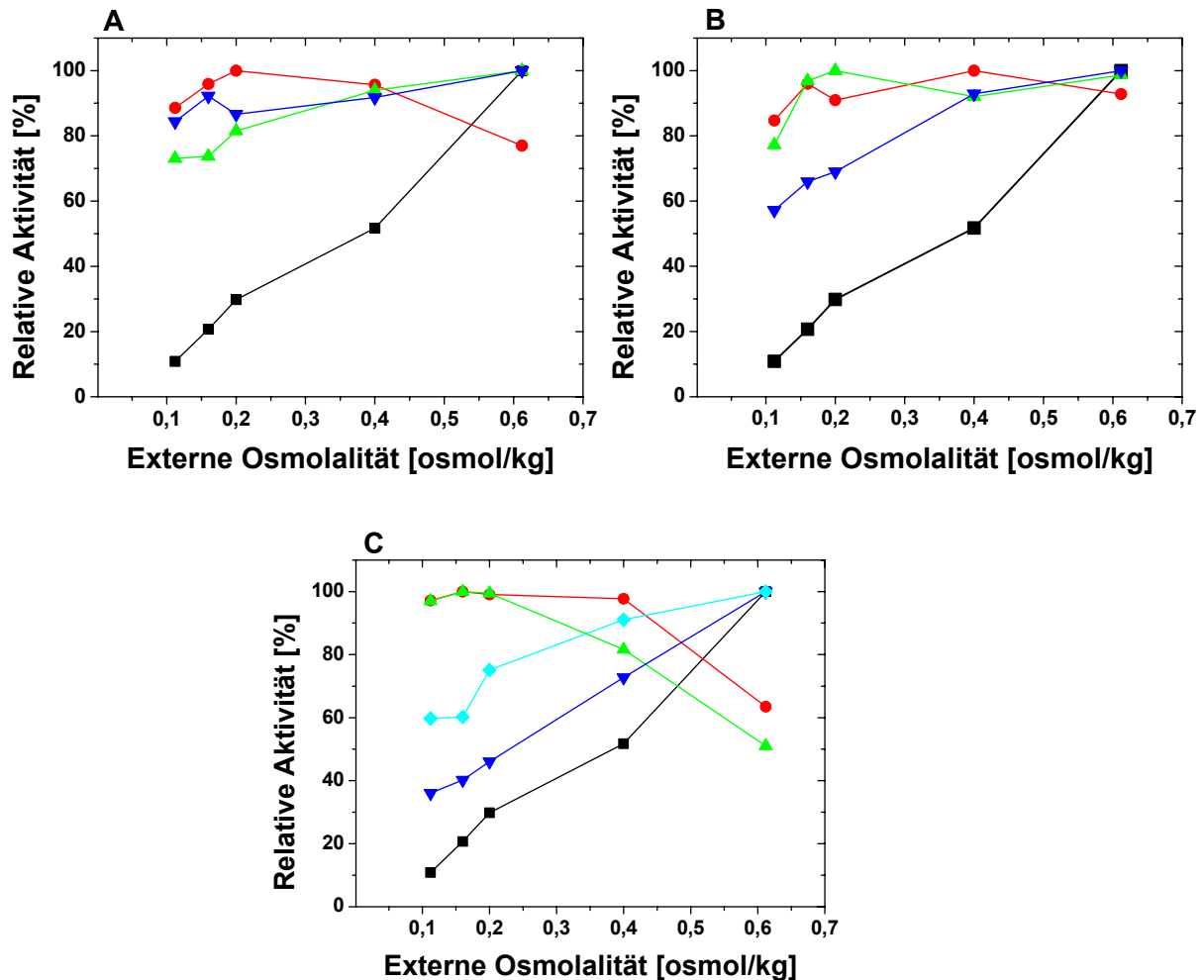
Basisaktivitäten waren im Vergleich zur Kontrolle etwas höher und das Optimum war bei BetP R558D zu höheren Osmolalitäten verschoben. Die maximal erreichten Raten lagen mit circa 90 nmol/min \* mg BTM fast so hoch wie bei der Kontrolle. Die BetP-Varianten R576A und R576E mit Substitutionen im weiter *downstream* gelegenen Bereich waren ebenfalls signifikant osmoreguliert. Die maximalen Raten blieben jedoch mit 45 und 75 nmol/min \* mg BTM unter der von BetP C252T. In dieser Position hatte die zugehörige Prolinmutanten (R576P) nur eine schwache Osmoregulation gezeigt (Abbildung 3.4B). Für diesen Teil kann zusammengefasst werden, dass im mittleren Bereich der C-terminalen BetP-Extension auch andere Substitutionen als Prolin die BetP-Regulation stören konnten. Im hinteren Bereich (Position R576) war dies nicht der Fall. Für den vorderen Abschnitt der C-Extension war das Bild hingegen nicht einheitlich.



**Abbildung 3.4: Transportaktivität von BetP C252T und C-terminaler Nicht-Prolinvarianten in Abhängigkeit der externen Osmolalität in *E. coli* MKH13.** Externer Puffer: 25 mM  $KP_i$ , pH 7,5; 100 mM NaCl. Die Aufnahmemessung wurde durch Zugabe von 250  $\mu$ M [ $^{14}C$ ]-Glycinbetain gestartet. Die Osmolalitäten wurden mit KCl eingestellt. Die Aufnahmeaktivitäten folgender Stämme sind gezeigt: C252T Kontrolle ■. (A) Y550A ●; E555A ▲; E555R ▼; R558A ◆; R558D ◄. (B) A564D ●; A564K ▲; R568A ▼; R568D ◆; R576A ◄; R576E ★.

### 3.1.4 Aktivitätsregulation C-terminaler BetP-Varianten im nieder-osmolaren Bereich

Für die Mehrzahl der zuvor beschriebenen C-terminalen BetP-Varianten (Prolin- und Nicht-Prolin-Substitutionen) war zwischen 0,24 und 0,4 osmol/kg externer Osmolalität ein leichter Anstieg der BetP-Aktivität verzeichnet worden. Mit der folgenden Messreihe sollte für einige Mutanten beispielhaft überprüft werden, ob diese BetP-Varianten eine Aktivierung im Bereich geringerer Osmolalitäten aufweisen. Wäre das der Fall, so läge bei



**Abbildung 3.5: Transportaktivität von BetP C252T und C-terminaler Varianten in *E. coli* MKH13 bei geringen externen Osmolalitäten.** Externer Puffer: 15 mM  $KP_i$ , pH 7,5; 50 mM NaCl. Die Aufnahmemessung wurde durch Zugabe von 250  $\mu$ M [ $^{14}$ C]-Glycinbetain gestartet. Die Osmolalitäten wurden mit KCl eingestellt. Dargestellt sind die relativen Aufnahmeaktivitäten. Der maximale Wert jeder Reihe wurde als 100% gesetzt. Folgende Stämme sind gezeigt: C252T Kontrolle ■. (A) A564P ●; V569P ▲; H573P ▼. (B) K575P ●; R576P ▲; A580P ▼. (C) A564K ●; A564D ▲; R576A ▼; R576E ◆.

diesen BetP-Varianten kein echter Verlust der Osmoregulation vor, sondern eine Optimumverschiebung zu geringeren Osmolalitäten. Um Osmolalitäten von 0,1 osmol/kg im externen Puffer einstellen zu können, musste die  $KP_i$ -Puffer Konzentration hier von 25 mM auf 15 mM und die NaCl Konzentration von 100 mM auf 40 mM herabgesetzt werden. Da Natrium das Co-Substrat für den BetP-Transporter ist und der  $K_m$ -Wert hierfür etwa 50 mM beträgt, konnten unter den hier gewählten Bedingungen schon geringe Veränderungen in der Natriumaffinität der BetP-Mutanten zu veränderten Absolutraten im Vergleich zur Kontrolle führen. Da der Focus bei diesem Versuch auf der Veränderung

und nicht dem Absolutwert der Rate lag, sind in Abbildung 3.5 zur Vereinfachung relative Werte dargestellt, wobei der Maximalwert jeder Einzelkurve als 100% gesetzt wurde.

Für die Prolinvarianten zwischen den Positionen A564 und K575 sowie für BetP A564K und A564D konnte im niederosmolaren Bereich eine signifikante Zunahme der BetP-Aktivität ausgeschlossen werden. Zwischen 0,1 und 0,4 osmol/kg veränderten sich die Werte um maximal 20%, während die Kontrolle hier von 10% auf 50% anstieg. Die unter Standardbedingungen als schwach osmotisch reguliert beziehungsweise osmotisch reguliert bezeichneten BetP-Varianten R576P und R576A/D zeigten auch im niederosmolaren Bereich eine schwache (R576P) beziehungsweise deutliche Stimulierung. Durch diese Messreihe im niederosmolaren Bereich konnten also eventuelle, unter Standardbedingungen verdeckte Stimulierungen ausgeschlossen werden. Das zuvor gewonnene Bild regulierter beziehungsweise nicht regulierter Mutanten wurde somit bestätigt.

### 3.1.5 Aktivitätsregulation C-terminaler BetP-Varianten in

#### *C. glutamicum* DHPF

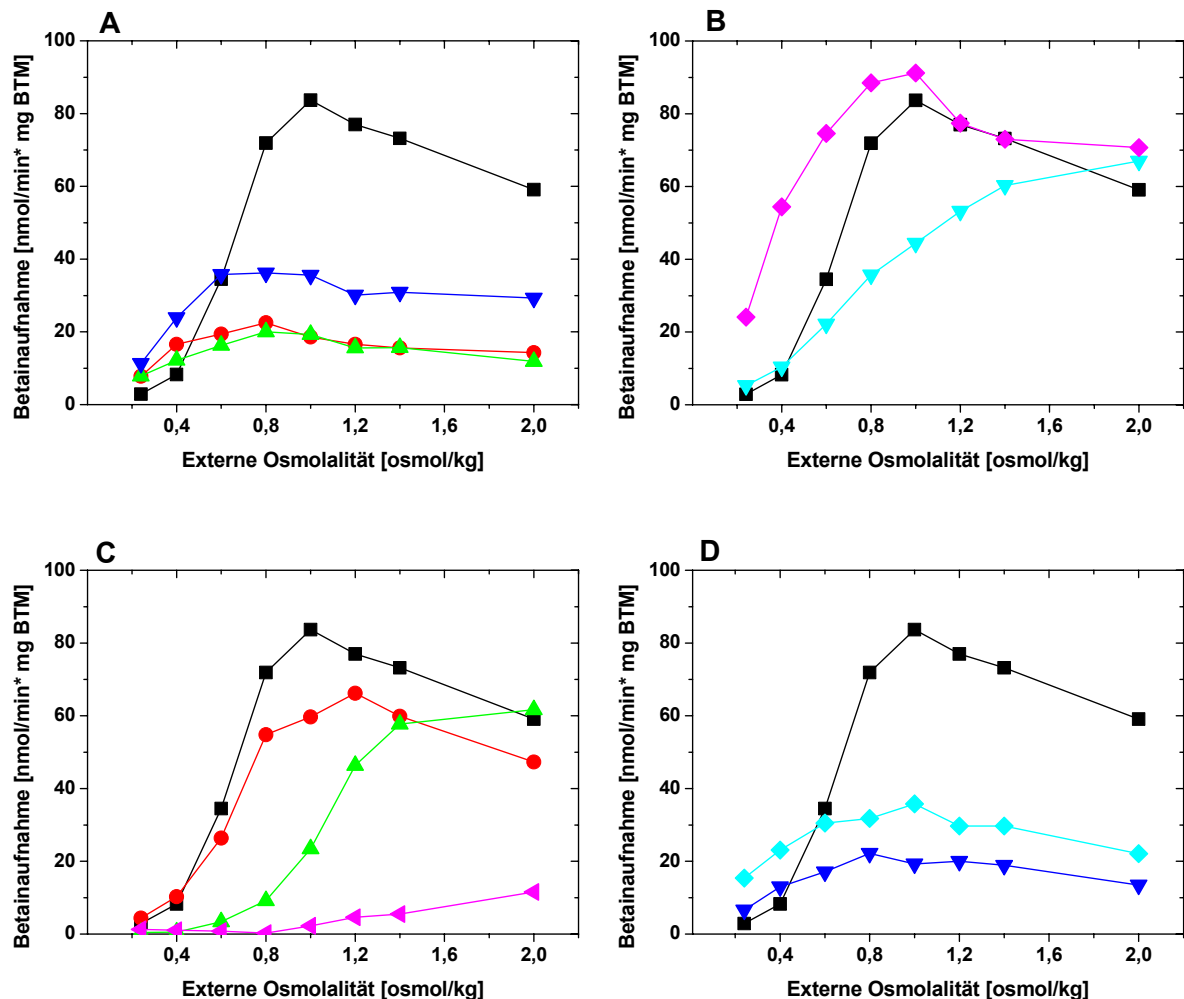
Es war bekannt, dass das Regulationsverhalten von BetP von der Membrenumgebung beeinflusst wird. So verschiebt sich zum einen in *C. glutamicum* Zellen im Vergleich zu *E. coli* Zellen das Aktivitätsoptimum zu höheren Osmolalitäten, zum anderen war beobachtet worden, dass Substitutionen in der Position 572, welche in *E. coli* zum Verlust der BetP-Regulation geführt hatten, in *C. glutamicum* die BetP-Regulation nicht beeinträchtigten (Schiller *et al.*, 2006). Durch Rekonstitution des BetP-Proteins in Liposomen unterschiedlicher Lipidzusammensetzungen konnte gezeigt werden, dass die in Zellen beobachteten Effekte auf den hohen Gehalt an negativ geladenem Phosphatidylglycerol in der Cytoplasmamembran von *C. glutamicum* im Vergleich zur *E. coli* Membran zurückzuführen sind (Schiller *et al.*, 2006). Daher wurden im Folgenden einige der zuvor heterolog in *E. coli* charakterisierten BetP-Varianten auch in *C. glutamicum* Zellen, also in der nativen Membrenumgebung, osmoregulatorisch analysiert. Es wurden BetP-Varianten mit Substitutionen im vorderen und zentralen Bereich ausgesucht, da durch Substitutionen im hinteren Helixbereich die BetP-Regulation bereits in *E. coli* Zellen nicht gestört werden konnte, was sowohl Daten aus dieser Arbeit (R582P; Abbildung 3.1E), als auch Daten aus vorherigen Arbeiten belegt hatten (Schiller, 2004; Ott, 2005). Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 3.6 zu sehen. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Einzelmessung.

Das osmoregulatorische Profil von BetP C252T nahm in *C. glutamicum* Zellen den für die Kontrolle typischen sigmoidalen Kurvenverlauf mit einem Aktivitätsoptimum bei 1,0 osmol/kg. Im Vergleich hierzu wiesen die BetP-Varianten A564P, R565P und V569P sowie A564K/D ein deutlich verändertes Aktivierungsprofil auf (Abbildung 3.6A und D). Ausgehend von einer leicht erhöhten Basisaktivität war ein Anstieg der Transportaktivität zwischen 0,24 und 0,8 osmol/kg auf circa 20 nmol/min \* mg BTM im Falle von BetP A564P, R565P und A564K beziehungsweise 40 nmol/min \* mg BTM (V569P, A564D) zu verzeichnen. Die maximalen Raten blieben deutlich unter dem Wert der Kontrolle (85 nmol/min \* mg BTM). Bei weiterer Erhöhung der Osmolalität nahmen die Raten marginal ab. In keinem Fall trat die wildtypische sigmoidale Aktivierungskurve auf. Diese Prolin- und Nicht-Prolinvarianten mit Substitutionen im zentralen Bereich der C-Domäne konnten somit als schwach (V569P und A564D) beziehungsweise nicht (A564P, R565P, A564K) osmoreguliert bezeichnet werden. Sie verhielten sich also in *E. coli* und in *C. glutamicum* Zellen ähnlich. Im Gegensatz dazu waren die Varianten K575P und R576P - mit weiter *downstream* gelegenen Prolinsubstitutionen - in *C. glutamicum* Membranumgebung signifikant osmotisch reguliert. Bei BetP K575P war der Verlauf der Aktivierungskurve etwas flacher als in der Kontrolle und das Optimum zu höheren Osmolalitäten verschoben. Die Aktivierung von BetP R576P verlief steiler als bei BetP C252T, wurde aber ebenfalls bei 1,0 osmol/kg maximal. Interessanterweise hatten diese beiden BetP-Mutanten in *E. coli* keine (K575P) beziehungsweise nur eine sehr schwache (R576P) Osmoregulation aufgewiesen. Ähnliches zeigte sich für die Nicht-Prolinvarianten Y550A und E555A mit Substitutionen im vorderen Bereich der C-terminalen BetP-Extension (Abbildung 3.6C). BetP Y550A, welches in *E. coli* nur schwach osmoreguliert war, zeigte hier in *C. glutamicum* die typische sigmoidale Aktivierungskurve mit im Vergleich zur Kontrolle etwas geringeren Raten und einer leichten Optimumverschiebung. Die zugehörige Prolinvariante Y550P hatte in beiden Membranumgebungen eine Deregulation gezeigt (Ott, 2005). Für die in *E. coli* nicht regulierte Variante E555A wurde in *C. glutamicum* ein typischer sigmoidaler Verlauf der Aktivierungskurve beobachtet, wobei die Aktivierungsschwelle leicht erhöht war und mit maximal 60 nmol/min \* mg BTM ebenfalls etwas geringere Raten als in der Kontrolle erreicht wurden. Im Gegensatz dazu führte eine Ladungsumkehrung in Position E555 (E555R) zu einer BetP-Variante, die in beiden Membranumgebungen nicht osmotisch reguliert war. E555R war in *C. glutamicum* nur sehr schwach aktiv.

Für die Charakterisierung der C-terminalen BetP-Varianten in *C. glutamicum* DHPF Zellen kann festgehalten werden, dass im zentralen Bereich der C-terminalen  $\alpha$ -Helix sowohl Prolin- als auch Nicht-Prolinsubstitutionen die Osmoregulation von BetP beeinträchtigten



(Varianten von A564, R565, V569). Hier hatte die veränderte Membranumgebung keinen signifikanten Einfluss auf die Regulation. Gleiches gilt für die Varianten E555R mit einer Ladungsumkehrung in einer weiter vorne gelegenen Position. Im Gegensatz dazu hatten die Nicht-Prolinvarianten Y550A und E555A mit Substitutionen im vorderen Bereich ihre Fähigkeit zur Osmoregulation in *C. glutamicum* Zellen wiedererlangt. Im hinteren Bereich der C-terminalen  $\alpha$ -Helix konnten interessanterweise sogar Prolinsubstitutionen die BetP-Regulation in der nativen Membranumgebung nicht mehr beeinträchtigen (K575P; R576P). Der Bereich der C-Domäne, in dem Substitutionen die BetP-Regulation stören konnten, war also in der nativen Membranumgebung insgesamt deutlich schmaler als in der *E. coli* Membranumgebung.



**Abbildung 3.6:** Transportaktivität von BetP C252T und C-terminaler Varianten in Abhängigkeit der externen Osmolalität in *C. glutamicum* DHPF. Externer Puffer: 25 mM  $KP_i$ , pH 7,5; 100 mM NaCl. Die Aufnahmemessung wurde durch Zugabe von 250  $\mu M$  [ $^{14}C$ ]-Glycinbetain gestartet. Die Osmolalitäten wurden mit KCl eingestellt. Die Aufnahmeaktivitäten folgender Stämme sind gezeigt: C252T Kontrolle ■. **Prolin-Varianten:** (A) A564P ●; R565P ▲; V569P ▼. (B) K575P ▼; R576P ◆. **Nicht-Prolin-Varianten:** (C) Y550A ●; E555A ▲; E555R ▼. (D) A564K ▼; A564D ◆.

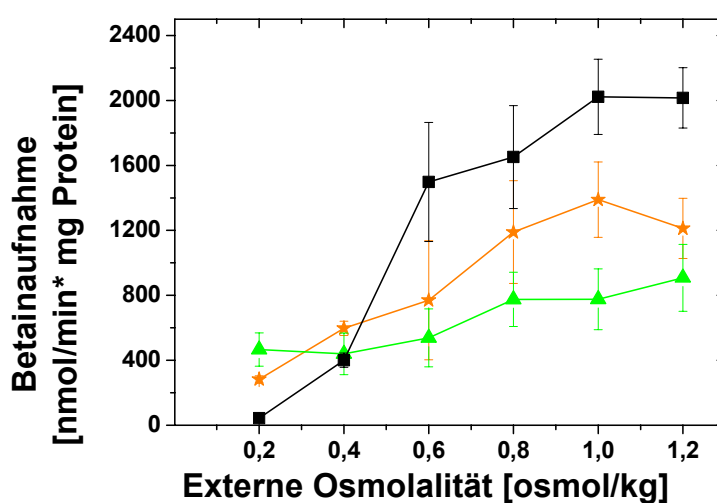
## 3.2 Regulation und Orientierung C-terminaler BetP-Varianten in Proteoliposomen

### 3.2.1 Einfluss der Kopfgruppenladung umgebender Membranlipide auf die Regulation C-terminaler BetP-Varianten

In *C. glutamicum* Zellen ist BetP schwerer aktivierbar als in *E. coli* Zellen. Außerdem wurde sowohl in dieser als auch in früheren Arbeiten beobachtet, dass Regulationsdefekte C-terminaler Prolinmutanten, die in *E. coli* Zellen auftreten, in *C. glutamicum* Zellen verschwinden. Durch Variation der Lipidzusammensetzung von BetP-Proteoliposomen konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass diese Effekte *in vitro* nachgestellt werden können, wenn der PG-Gehalt der Liposomen erhöht wird (Schiller, 2004). Hieraus konnte geschlossen werden, dass die in Zellen beobachteten Unterschiede in der BetP-Regulation durch den hohen Anteil an PG in der Cytoplasmamembran von *C. glutamicum* im Vergleich zur *E. coli* Membran ausgelöst werden. Nun sollte überprüft werden, ob dieser Effekt PG-spezifisch ist oder ob er generell mit der negativen Ladung der Kopfgruppe zusammenhängt. Hierzu wurde die Regulation zweier C-terminaler BetP-Varianten in Proteoliposomen untersucht, welche mit DOPS (Dioleoylphosphatidylserin) dotiert waren. Dieses synthetische Phospholipid besitzt wie DOPG eine negative Nettoladung. Für den Versuch wurden die Varianten BetP E572P und E572K ausgewählt. BetP E572P war sowohl in *E. coli* Lipiden als auch in DOPG-dotierten Liposomen dereguliert gewesen. BetP E572K hatte seine Osmoregulation in DOPG-dotierten Liposomen wiedererlangt (Schiller *et al.*, 2006). Die beiden *betP*-Mutanten sowie *betP*-C252T wurden in *E. coli* DH5 $\alpha$  heterolog exprimiert. Die synthetisierten Proteine wurden dann über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie gereinigt und in *E. coli* Lipiden rekonstituiert. Die Liposomen wurden anschließend mit DOPS fusioniert, so dass der Anteil von DOPS am Gesamtlipid 33% betrug.

Abbildung 3.7 zeigt die Ergebnisse der Transportmessungen mit diesen Proteoliposomen. BetP C252T zeigte die typische Optimumverschiebung von 0,6 osmol/kg zu höheren externen Osmolalitäten, die auch in DOPG dotierten Liposomen beobachtet worden war (Schiller *et al.*, 2006). Beide C-terminalen Varianten zeigten bei 0,2 osmol/kg eine höhere Basisaktivität als die Kontrolle. BetP E572P zeigte hier zwischen 0,2 und 1,2 osmol/kg einen schleichenden, annähernd linearen Anstieg der Aktivität von 500 auf 900 nmol/min \*mg Protein. BetP E572K hingegen zeigte eine deutliche osmotische Aktivierung, die eine leicht sigmoidalen Optimumkurve beschrieb und ebenso wie bei

BetP C252T bei 1,0 osmol/kg maximal wurde. Die absoluten Raten blieben allerdings etwa ein Drittel unter denen der C252T-Kontrolle. Tabelle 3.1 vergleicht die hier ermittelten Aktivierungsfaktoren mit denen, die in DOPG-dotierten Proteoliposomen ermittelt worden waren (Schiller *et al.*, 2006). Es wird deutlich, dass die beiden negativ geladenen Phospholipide DOPG und DOPS qualitativ den gleichen Einfluss auf die Regulation dieser C-terminalen BetP-Varianten haben. Hiermit konnte also gezeigt werden, dass nicht die Kopfgruppe an sich, sondern ihre negative Ladung für die beobachteten Membraneffekte auf die BetP-Regulation entscheidend ist.



**Abbildung 3.7: Transportaktivität von BetP C252T und C-terminaler Varianten in Abhängigkeit der externen Osmolalität in Proteoliposomen aus *E. coli* Lipiden mit 33% DOPS.** Interner Puffer: 100 mM  $KP_i$ ; externer Puffer: 50 mM  $NaP_i$ . Die Osmolalität wurde mit Sorbitol eingestellt. Waschpuffer für Filter: 50 mM  $NaP_i$ +Sorbitol (isoosmolar zu externem Puffer). Gezeigt sind die Transportraten für: BetP C252T ■; E572P ▲; E572K ★.

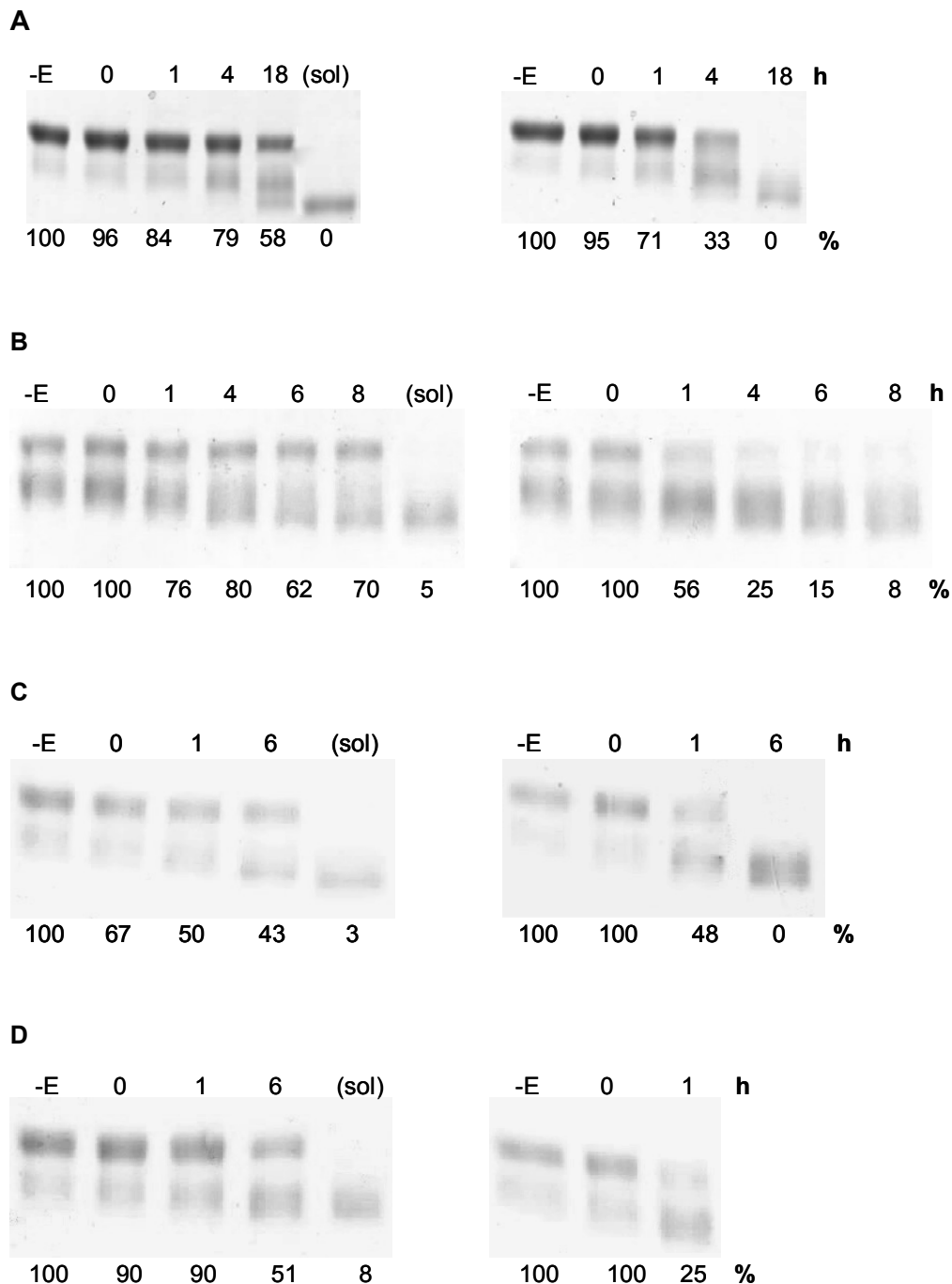
**Tabelle 3.1: Aktivierungsfaktoren der BetP Varianten E572P und E572K in Proteoliposomen aus *E. coli* Lipiden mit 33% DOPS bzw. DOPG.** Die Faktoren sind jeweils auf die maximale Aktivität im Verhältnis zur Grundaktivität bei 0,2 osmol/kg bezogen. Der hohe Faktor bei „C252T, DOPS“ kommt dadurch zu Stande, dass die Grundaktivität hier sehr viel geringer ausfiel als in DOPG haltigen Liposomen (Aktivierungsfaktoren in DOPG nach Schiller 2006).

	E572P	E472K	C252T
<b>Aktivierungsfaktor in 33% DOPS</b>	1,95	4,91	47,02
<b>Aktivierungsfaktor in 33% DOPG</b>	2	5	14

### 3.2.2 Einfluss der Membranumgebung sowie C-terminaler Substitutionen auf die Orientierung von BetP in Proteoliposomen

Die funktionale Rekonstitution von BetP in Proteoliposomen hat in der Vergangenheit maßgeblich zur Charakterisierung der sensorischen Eigenschaften des Transporters beigetragen. Da Kenntnisse bezüglich der BetP-Orientierung in Proteoliposomen die Voraussetzung für eine korrekte Deutung von Messdaten sind, wurden zur Vervollständigung existierender Daten am Rande dieser Arbeit zwei Aspekte zur Orientierung von BetP in Proteoliposomen untersucht. Dies war zum einen die Frage, ob der PG-Gehalt der Liposomen einen Einfluss auf die Orientierung des Transporters hat und zum anderen, ob deregulierte BetP-Varianten mit Aminosäuresubstitutionen im C-terminalen Bereich anders orientiert sind als BetP C252T, das wie der Wildtyp reguliert wird und in dieser Arbeit als Kontrolle verwendet wurde. In einer früheren Arbeit war für BetP C252T rekonstituiert in *E. coli* Lipiden eine unidirektionale *right-side-out*-Orientierung nachgewiesen worden (Schiller, 2004). Es ist bekannt, dass Veränderungen der Oberflächenladung am Protein oder Lipid sowie das Prozedere von Frieren-Tauen, welches zur Variation der Lipidzusammensetzung verwendet wurde, die Orientierung des Proteins beeinflussen können (Steverding *et al.*, 1989; Sascha Nicklisch, persönliche Mitteilung). Im Aktivitäts-assay mit Proteoliposomen werden durch die vorgegebene Richtung des Membranpotentials sowie durch die Pufferzusammensetzung nur *right-side-out* orientierte BetP-Moleküle erfasst. Würde sich unter einer bestimmten Bedingung die Orientierung eines signifikanten Anteiles der BetP-Moleküle ändern, so hätte dies eine Verfälschung der absoluten Transportraten - bezogen auf die Gesamtproteinmenge - im Vergleich zu Standardbedingungen zur Folge. Unterschiedliche Aktivitätshöhen einzelner Mutanten könnten also durch unterschiedliche Orientierungsverhältnisse von BetP verursacht werden.

Durch ortsspezifische Proteolyse wurde hier die Orientierung von BetP C252T in Liposomen aus reinen *E. coli* Lipiden mit der Orientierung in DOPG dotierten Liposomen verglichen. Des Weiteren wurde die Orientierung der C-terminalen BetP-Varianten E572P und E572K untersucht, die beide in *E. coli* Membranumgebung nicht osmotisch reguliert und nur schwach aktiv sind. Ganze Proteoliposomen wurden extern mit Aminopeptidasen versetzt, so dass nur BetP-Moleküle mit einer *in-side-out* Orientierung für die Proteolyse zugänglich waren. Als Kontrolle wurde jeweils ein Aliquot solubilisierter Proteoliposomen mit Aminopeptidasen inkubiert. Der sukzessive N-terminale Abbau von BetP über die Zeit wurde durch SDS-PAGE verfolgt. Abbildung 3.8A zeigt die Ergebnisse für BetP C252T in *E. coli* Lipiden. In der solubilisierten Probe war BetP nach 4 h zu 33% und nach 18 h zu 100% bis zu einer Größe von circa 40 kDa abgebaut. In intakten Proteoliposomen waren



**Abbildung 3.8: Nachweis der Orientierung von BetP-Varianten mittels ortsspezifischer Proteolyse durch Amino-peptidasen.** Links: Intakte Proteoliposomen Rechts: Kontrollen mit in 1% Triton X-100 solubilisierten Proteoliposomen. **(A)** BetP C252T in Liposomen aus *E. coli* Lipiden. **(B)** BetP C252T in Liposomen aus *E. coli* Lipiden mit 33%DOPG dotiert. **(C)** BetP E572P in Proteoliposomen aus *E. coli* Lipiden. **(D)** BetP E572K in Proteoliposomen aus *E. coli* Lipiden. Probenahme: Vor Enzymzugabe (-E); Unmittelbar nach Enzymzugabe (0); 1 - 6, 8 oder 18 h nach Enzymzugabe, die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 1% EDTA und 10fach Complete-Proteaseinhibitor gestoppt. sol: nach 18 (A), 8 (B+C) oder 6 (D) Stunden wurden die intakten Proteoliposomen mit 1% Triton-X-100 solubilisiert und für weitere 2,5 Stunden mit den Peptidasen inkubiert. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE (12,5 %) und Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung. Die relative Menge an unverdautem Enzym wurde mit der Software PCBAS quantifiziert und ist in Prozent angegeben. Die Werte wurden auf die -E Probe normiert.

nach 4 h noch knapp 80% nach 18 h noch 58% des Proteins unverdaut. Die Daten belegten, dass nur etwa 2/3 der BetP-Moleküle *right-side-out* orientiert waren. Abbildung 3.8B zeigt das Experiment mit BetP C252T in DOPG dotierten Liposomen. Hier blieben ebenfalls etwa 2/3 des Proteins intakt (leichte Schwankungen in den Prozentangaben beruhen auf der Fehleranfälligkeit des Quantifizierungsprogrammes). Die Lipidvariation hatte also keinen Einfluss auf die Orientierung von BetP. Für die Varianten BetP E572P und E572K zeigte sich, dass etwa 50% der BetP Moleküle *right-side-out* und 50% *in-side-out* orientiert waren. Hier war die Verteilung der beiden Orientierungen im Vergleich zu BetP C252T also leicht aber nicht bedeutend verändert.

In allen Experimenten wurde also eine ähnliche bidirektionale Orientierung der BetP-Moleküle in den Liposomen nachgewiesen, auch für BetP C252T in reinen *E. coli* Lipiden. Die hierfür vormals nachgewiesene unidirektionale *right-side-out*-Orientierung konnte also nicht verifiziert werden (Schiller, 2004). Da die Rekonstitution von Membranproteinen ein hochempfindlicher Vorgang ist, sind möglicherweise geringfügige Variationen im Rekonstitutionsprozedere bedingt durch wechselnde Lipid- oder Detergenzchargen die Ursache hierfür. Es wäre auch möglich, dass es sich bei den vermeintlich *inside-out* orientierten BetP-Molekülen um denaturiertes BetP-Protein handelt, das gar nicht korrekt in die Vesikel integriert ist, sondern unspezifisch an der Liposomenoberfläche haftet und von daher N-terminal abgebaut werden kann. Unabhängig davon, welche Erklärung zutrifft, sind die vorliegenden Daten hinreichend um zu postulieren, dass weder eine Lipidvariation noch C-terminale Aminosäuresubstitutionen die BetP-Orientierung in Proteoliposomen verändern. Denn unter allen Bedingungen wurde dasselbe Orientierungsverhältnis nachgewiesen. Daher muss die BetP-Orientierung nicht in die Bewertung proteoliposomaler Transportdaten einbezogen werden.

### 3.3 Aktivitätsregulation N-terminal deletierter BetP-Varianten

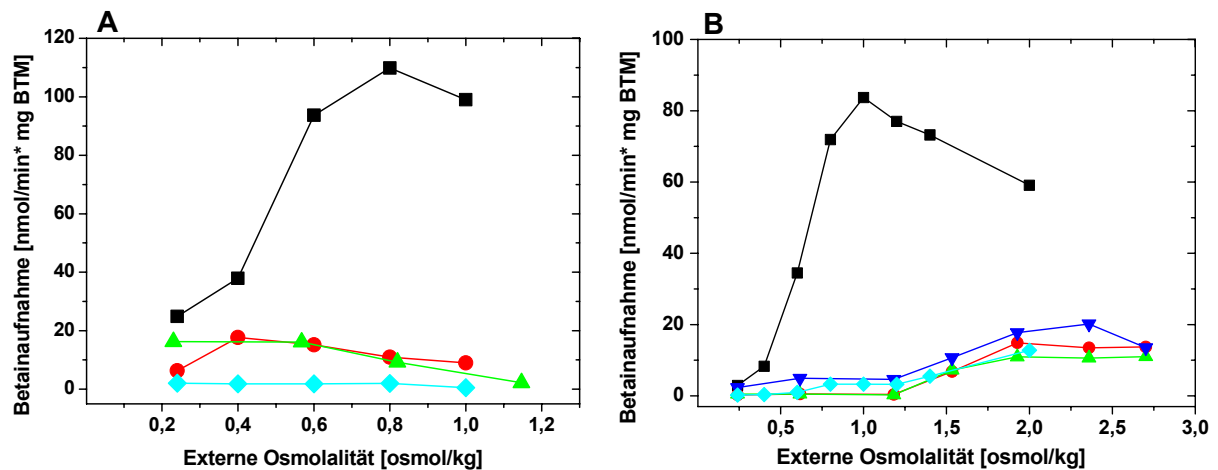
Über die Bedeutung der N-terminalen BetP-Extension für die Regulation des Transporters unter Osmostressbedingungen war zu Beginn dieser Arbeit wenig bekannt. N-terminal deletierte BetP-Varianten waren in *C. glutamicum* Zellen osmotisch reguliert gewesen, hatten aber im Vergleich zum BetP-Wildtyp eine deutlich erhöhte Aktivierungsschwelle gezeigt (Peter *et al.*, 1998a). Daher war die N-terminale BetP-Domäne im Gegensatz zur C-terminalen Sensordomäne als Modulator der BetP-Aktivität bezeichnet worden. Auf Grund der interessanten Membraneffekte, die sich aktuell für C-terminale BetP-Varianten

ergeben hatten, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Funktion der N-Domäne erneut untersucht, indem N-terminal verkürzte BetP-Proteine in verschiedenen Membrenumgebungen charakterisiert wurden. Hierzu standen die Varianten BetP  $\Delta$ N29 und  $\Delta$ N29E44A/E45A/E46A mit drei Aminosäuresubstitutionen (im Folgenden  $\Delta$ N29E bezeichnet), bei denen etwa die Hälfte der Extension deletiert war, und  $\Delta$ N52 sowie  $\Delta$ N53, bei denen nahezu die gesamte N-Extension fehlte, zur Verfügung. Diese waren als mögliche Kandidaten für die Gewinnung von Kristallen zur Röntgenstrukturauflösung in der Arbeitsgruppe Ziegler (MPI für Biophysik, Frankfurt am Main) konstruiert worden.

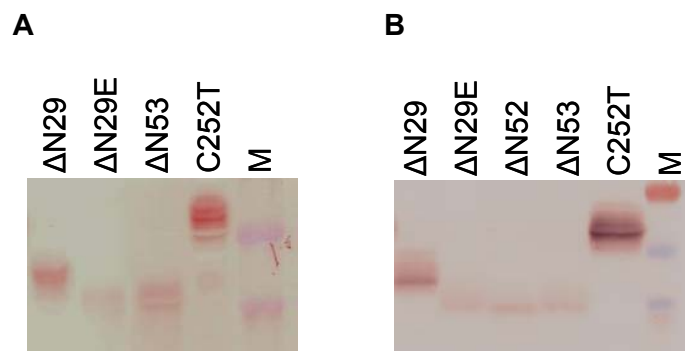
Die *betP*-Mutanten wurden in *E. coli* MKH13 und *C. glutamicum* DHPF plasmidcodiert exprimiert (Vektoren: pASK-iBA 5 bzw. 7; pXMJ19) und in Transportmessungen auf ihre osmoregulatorischen Eigenschaften untersucht. Für alle Mutanten konnten nur geringe Transportraten detektiert werden (Abbildung 3.9). Western Blot Analysen belegten, dass der Einbau dieser BetP-Derivate in die Cytoplasmamembran sowohl von *E. coli* als auch von *C. glutamicum* Zellen deutlich schlechter war als bei BetP C252T (Abbildung 3.10). Die Banden der BetP-Varianten waren entsprechend der Verkürzung im Vergleich zur Kontrolle zu geringeren Molekulargewichten verschoben. BetP  $\Delta$ N29E lief in der SDS-PAGE bei kleineren Massen als  $\Delta$ N29, was möglicherweise mit der veränderten Netto-Ladung des Proteins bedingt durch das fehlende Glutamat *-cluster* zusammenhängt.

In *C. glutamicum* Zellen zeigten alle N-terminalen BetP Varianten zwischen 0,24 und 1,0 osmol/kg nur minimale und zum Teil leicht ansteigende Raten ( $\Delta$ N52;  $\Delta$ N53). Oberhalb von 1,0 osmol/kg waren deutlich Zunahmen der Raten zu verzeichnen, die erst bei 2,0 bzw. 2,2 osmol/kg maximal wurden (Abbildung 3.9B). Diese BetP-Varianten zeigten somit eine ähnlich erhöhte Aktivierungsschwelle, wie sie früher bereits für andere N-terminal verkürzte BetP-Varianten beobachtet worden war (Peter *et al.*, 1998a). Die Transportmessungen in *E. coli* Zellen ergaben jedoch überraschenderweise, dass keine der Mutanten osmotisch reguliert war (Abbildung 3.9A). BetP  $\Delta$ N29E zeigte ausgehend von 15 nmol/min \* mg BTM einen leichten, aber stetigen Abfall der Transportrate mit zunehmender externer Osmolalität. BetP $\Delta$ N29 zeigte zwischen 0,24 und 0,4 osmol/kg einen leichten Anstieg der Aktivität, mit steigenden Osmolalitäten war aber auch hier eine Abnahme der Raten zu verzeichnen. BetP $\Delta$ N53 zeigte nur minimale Transportaktivität, jedoch war auch hier der Trend erkennbar, dass die Rate mit zunehmender Osmolalität absank. Zwar wurden bei den *E. coli* Daten nicht so hohe Osmolalitäten getestet wie in *C. glutamicum* Zellen, da aber alle BetP-N-Varianten schon im Bereich zwischen 0,4 und 1,0 bzw. 1,2 leicht abfallende Raten zeigten, ist von einer Aktivierung im höherosmolaren Bereich nicht auszugehen.

Alle N-terminal verkürzten BetP-Varianten zeigten also abhängig von der Membrenumgebung entweder einen Verlust der Osmoregulation (*E. coli* Zellen) oder sie waren reguliert aber mit einer Verschiebung des Aktivitätsoptimums zu hohen Osmolalitäten (*C. glutamicum* Zellen). Hiermit wurde erstmals auch für N-terminal veränderte BetP-Varianten eine membranabhängige Regulation beobachtet.



**Abbildung 3.9: Transportaktivität von BetP C252T und N-terminaler Varianten in Abhängigkeit der externen Osmolalität.** (A) Aktivitäten in *E. coli* MKH 13 Zellen. (B) Aktivitäten in *C. glutamicum* DHPF Zellen. Externer Puffer: 25 mM  $KP_i$ , pH 7,5; 100 mM NaCl. Die Aufnahmemessung wurde durch Zugabe von 250  $\mu$ M  $[^{14}C]$ -Glycinbetain gestartet. Die Osmolalitäten wurden mit KCl oder NaCl eingestellt. C252T Kontrolle ■;  $\Delta$ N29 ●;  $\Delta$ N29E ▲;  $\Delta$ N52 ▼; ◆  $\Delta$ N53.



**Abbildung 3.10: Western Blot Analyse der Synthese von BetP C252T und N-terminaler BetP-Varianten.** Für den Western Blot erfolgte die Zellanzucht und Induktion in gleicher Weise wie für die Transportmessungen. Isolierte Membranen wurden über SDS-PAGE (12,5%) nach Laemmli getrennt. Die BetP-Proteine wurden durch polyklonale Antikörper gegen BetP nachgewiesen. C252T: Positivkontrolle (Sollgröße: 64,2 kDa). M: Proteinmarker; Molekulargewichte der Markerbanden von oben nach unten in kDa: 72 (nur A), 55, 40. Für alle N-terminalen Derivate wurden geringer Mengen als bei der Kontrolle nachgewiesen (A) *E. coli* MKH13 Stämme: Gesamtprotein: 40  $\mu$ g. (B) *C. glutamicum* DHPF Stämme: Gesamtprotein: 40  $\mu$ g.



## 3.4 Interaktionsstudien

### 3.4.1 Intramolekulare Interaktionen der C-terminalen Domäne

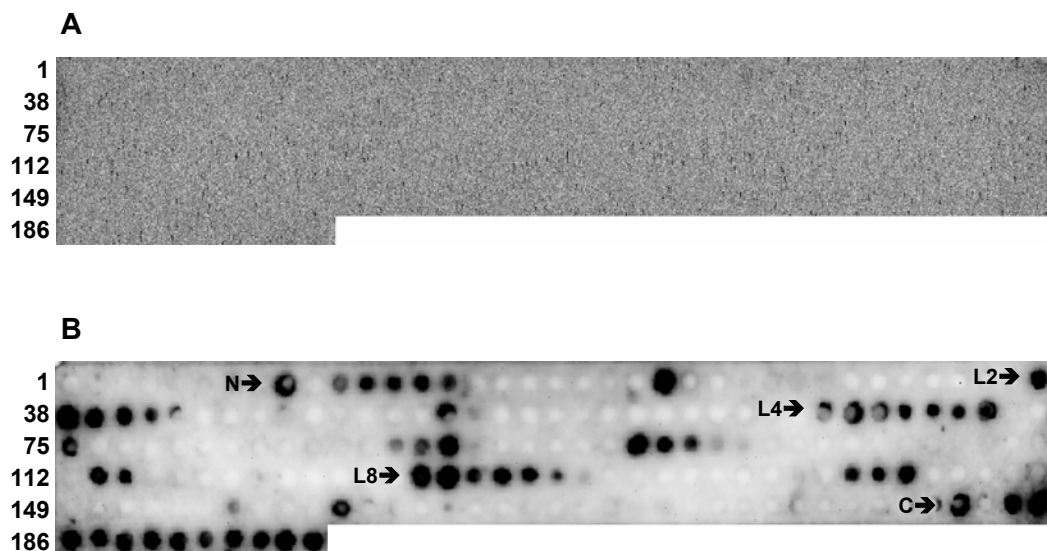
#### 3.4.1.1 *Peptide array* Experimente

Die Detektion von Kalium zur Regulation der BetP-Aktivität könnte direkt über die C-terminale BetP-Domäne erfolgen, bislang konnte aber noch keine Kaliumbindestelle in der C-Extension identifiziert werden. Es ist daher denkbar, dass die kaliumspezifische Sensorik des BetP-Proteins nicht alleine über die C-Domäne erfolgt, sondern über Interaktionen der Domäne mit anderen cytoplasmatischen Proteinbereichen vermittelt wird. Des Weiteren könnten Interaktionen der C-Domäne auch für die Transduktion des aktivierenden Signals wichtig sein. Daher wurde in der BetP-Sequenz nach mit der C-terminale Domäne interagierenden Bereichen gesucht. Zu diesem Zweck wurden *peptide array* Experimente durchgeführt. Hierbei war die BetP-Aminosäuresequenz in Form synthetischer Oligopeptide auf einer Cellulosemembran in 195 Peptid-*spots* abgebildet. Jedes Peptid umfasste dabei fünfzehn Aminosäurereste, wobei von Peptid zu Peptid eine Verschiebung um drei Aminosäuren vorlag. Die C-terminale BetP-Domäne wurde in *E. coli* Zellen als rekombinantes Protein, fusioniert an den C-Terminus von GST, synthetisiert und über Glutathion-Affinitätschromatographie gereinigt. Nach Inkubation der Cellulosemembran mit dem gereinigten Fusionsprotein erfolgte die Detektion der *spots* mit gebundener C-Extension über einen GST-spezifischen Antikörper.

In Abbildung 3.11A ist zunächst das Kontrollexperiment dargestellt, in dem die Membran mit dem GST-Protein (ohne BetP-C-Domäne) inkubiert wurde. Für das GST-Protein konnte keine Interaktion mit den BetP-Fragmenten auf der Membran nachgewiesen werden. Somit waren unspezifische Interaktionen des GST-Proteins mit den Peptiden sowie Kreuzreaktionen des GST-Antikörpers mit den Peptiden ausgeschlossen. In Abbildung 3.11B ist das Ergebnis des Experimentes gezeigt, wenn die *peptide array* Membran mit dem Fusionsprotein aus GST und der BetP-C-Domäne inkubiert wurde. Hier konnte die Bindung der C-Domäne an verschiedene Peptid-*spots* nachgewiesen werden. Ein lineares Bindemotiv sollte auf Grund der Überlappung der Peptidsequenzen ein Interaktionssignal in mehreren hintereinander liegenden *spots* auslösen. Ausgedehnte Interaktionen konnten für Peptide nachgewiesen werden, die folgenden BetP-Bereichen entsprachen: dem membranständigen Bereich der N-terminalen Domäne, den cytoplasmatischen Schleifen (*loops*) 2, 4 und 8 und der C-Domäne selbst. Reihen von nur drei positiven *spots* traten für die Sequenzen der cytoplasmatischen Schleife 6 als auch der periplasmatischen Schleifen 5 und 9 auf. Die Sequenzen der interagierenden

Bereiche sind in Tabelle 3.2 angegeben. Keine Signalreihe ergaben die Peptidsequenzen der Schleifen 10 (cytoplasmatisch) sowie 1, 3, 7 und 11 (periplasmatisch).

Die Einführung eines Prolinrestes in die C-terminale BetP-Extension führt zum Verlust der Osmoregulation des Transporters. Es ist möglich, dass diese Deregulation, mit einem veränderten Interaktionsverhalten der C-Domäne zusammenhängt. Das *peptide array* Experiment wurde daher auch mit den C-Domänen der beiden deregulierten BetP-Varianten Y550P und E572P durchgeführt. In diesem *in vitro* System konnte jedoch kein unterschiedliches Interaktionsverhalten einer veränderten C-Domäne im Vergleich zur C-Domäne mit Wildtypsequenz nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Sollten die im *peptide array* beobachteten Interaktionen der C-Domäne direkt in die Kaliumdetektion involviert sein, so wäre es möglich, dass die Interaktion von der  $K^+$ -Konzentration beeinflusst wird. Jedoch hatten weder eine Variation der KCl noch eine Variation der NaCl Konzentration einen Einfluss auf die Interaktion der C-Domäne mit den Peptiden auf der Membran (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.11: Interaktionen der C-Domäne im *peptide array*.** Peptide, welche Abschnitten von je fünfzehn Aminosäureresten der BetP-Sequenz entsprechen, wurden durch Parallelsynthese mittels Fmoc-Chemie auf die Membran aufgebracht. Von *spot* zu *spot* betrug die Verschiebung in der Sequenz drei Aminosäurereste. Die genauen Peptidsequenzen sind in Anhang 6.2 aufgelistet. Die Nummern geben die laufende Nummer des ersten *spots* einer Zeile an. **(A)** Negativkontrolle: Die Membran wurde mit dem GST-Protein (1µg/ml) inkubiert. **(B)** Die Membran wurde mit dem GST-C-BetP-Fusionsprotein inkubiert (1 µg/ml; 31 nM). Der Nachweis des gebundenen GST beziehungsweise des rekombinanten Proteins erfolgte durch ein GST-spezifisches IgG-Peroxidase Konjugat. Es konnten Interaktionen des rekombinanten Proteins mit verschiedenen ausgedehnten BetP-Sequenzbereichen nachgewiesen werden: N: N-Extension; L2, L4, L8: *loops* 2, 4 und 8; C: C-Extension (Sequenzen der interagierenden Bereiche siehe Tabelle 3.2 und Topologiemodell Anhang 6.1).

**Tabelle 3.2: Peptidsequenzen der positiven *peptide array spots* und Zuordnung zu BetP-Proteinbereichen.** Angegeben sind die überlappenden Sequenzbereiche der *spots*. \*In diesen Fällen waren Anfang und/oder Ende der Spotreihe bei verschiedenen Versuchswiederholungen nicht immer genau identisch (N-Extension, L4, L8, C-Domäne). Hier sind die Kernbereiche, die immer positiv waren, **fett und kursiv** hervorgehoben. Nettoladungen berechnet nach <http://www.embl-heidelberg.de/cgi/pi-wrapper.pl>.

	Region	Peptidsequenz	Nettoladung bei pH 7,6
Reihen $\geq$ 3 Spots:	N-Extension	*ELAGLLENPTN <b>EGKLADAEIIIILE</b> <b>GEDTQASLNW</b>	-9
	L2	AASKFGTIR	+2
	L4	* <b>STFRVGRKQLLSSAFVPLIGE</b> K	+3
	L8	<b>LARISGRSIRGFIL</b>	+4
	C-Domäne	*DVIYLEYREQQRFNAR <b>LARERRVHN</b> <b>EHRKRELAAKRRRERKASGAGKRR</b>	+11
	Reihen mit 3 Spots:	L5	LSAANIIED
L6		FSAISGVGK	+1
L9		GESIWGDGA	-2

Für die *peptide array* Experimente kann festgehalten werden, dass die isolierte C-Domäne *in vitro* Interaktionen mit bestimmten BetP-Bereichen einging. Die Tatsache, dass nicht alle Peptide, die zu den hydrophilen Proteinbereichen gehörten (Schleifen 1, 10 und 11), ein Signal ergaben, sprach für die Spezifität der beobachteten Interaktionen. Diese wurde weiterhin durch die Beobachtung unterstrichen, dass nicht nur Interaktionen mit Peptiden auftraten, die entgegengesetzt der C-Domäne negativ geladen sind (z. B. das N-Peptid), sondern dass auch Interaktionen mit Peptiden nachgewiesen wurden, welche wie die C-Domäne einen positiven Ladungsüberschuss besitzen. In zwei Fällen traten auch punktuelle Interaktionen mit Sequenzen periplasmatischer Regionen (Schleifen 5 und 9) auf. Da diese jedoch im in die Membran integrierten Gesamtprotein durch die unterschiedliche Kompartimentierung nicht für die C-Domäne zugänglich sind, sind diese *in vivo* nicht relevant. Prinzipiell erlaubten die *peptide array* Daten lediglich eine „Ja/Nein-Aussage“ bezüglich einer Interaktion. Eine Quantifizierung war mit dieser Methode jedoch nicht möglich. Diese könnte künftig über andere Methoden wie Fluoreszenzanisotropie oder SPR-Spektroskopie erfolgen.

### 3.4.1.2 Konkurrenzexperimente mit Peptiden in Proteoliposomen

Im Folgenden sollten die Daten der *peptide arrays* durch eine unabhängige Methode überprüft werden. Für die indirekte Untersuchung der Interaktionen im Kontext des Gesamtproteins in einer Membran wurden Konkurrenzexperimente mit Peptiden in Proteoliposomen durchgeführt. Hierdurch sollte eine mögliche Funktion dieser Interaktionen im BetP-Regulationsmechanismus aufgedeckt werden. Das BetP C252T Protein wurde zunächst über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie gereinigt und in Liposomen rekonstituiert. Diese Liposomen wurden dann durch drei Zyklen von Frieren-Tauen und Extrudieren mit synthetischen Peptiden beladen, deren Sequenz jenen entsprach, die in den *peptide array* Experimenten mit der C-Domäne interagiert hatten. Im Falle einer Interaktion der Peptide im Lumen der Liposomen mit den C-Domänen der *right-side-out* orientierten BetP-Proteine wurde erwartet, dass die Regulation von BetP beeinflusst würde. Bezogen auf das interne Proteoliposomenvolumen wurde ein etwa 10facher molarer Peptidüberschuss gegenüber der Menge an BetP-Protein in den Liposomen geschleust. Das osmoregulatorische Verhalten von BetP in diesen Proteoliposomen wurde dann durch radiochemische Transportmessungen bestimmt. Die Einschleusungseffizienz für Peptide wurde mittels eines fluoreszenz-*gelabelten* Peptides fluoreszenzspektroskopisch überprüft (Daten nicht gezeigt).

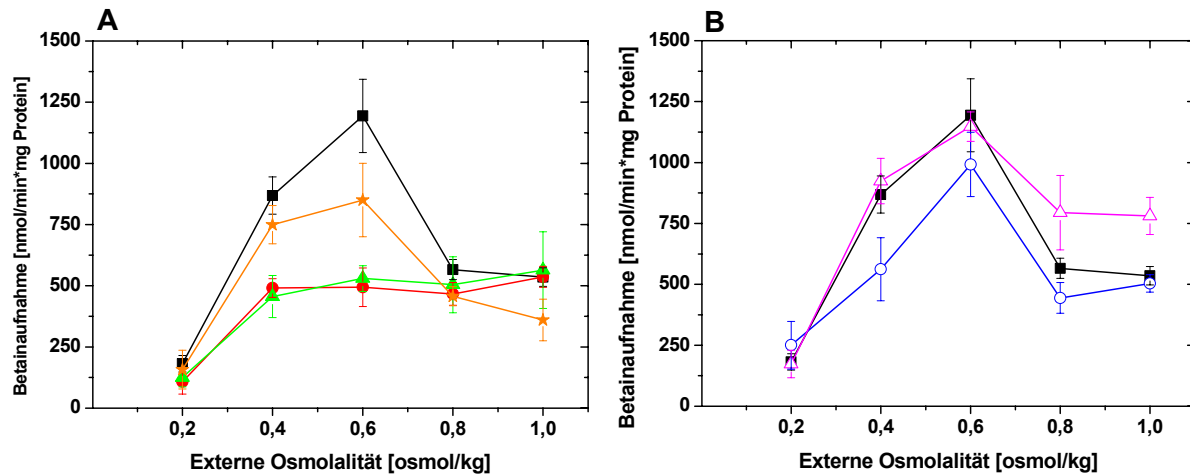
Aus den *peptide array* Ergebnissen wurden für diesen Versuch die Sequenzen der *loops* 4 und 8 ausgesucht, da diese auch schon in früheren *resonant mirror* Studien, als mögliche C-Domäne Interaktionspartner gefunden worden waren (Burger, 2002). Des Weiteren wurde das N-Domäne Peptid verwendet, da die Charakterisierung N-terminal deletierter BetP-Varianten Hinweise auf eine Beteiligung der N-Domäne in der BetP-Regulation geliefert hatte. Als Negativkontrollen dienten eine *random* Sequenz von *loop* 8 sowie *loop* 10, der in den *peptide arrays* negativ gewesen war (Peptidsequenzen siehe Tabelle 3.3). Die zuvor beobachtete, interessant erscheinende C-Domäne-C-Domäne Interaktion konnte aus technischen Gründen nicht weiter verfolgt werden.

**Tabelle 3.3: Sequenzen der synthetischen Peptide für Konkurrenzexperimente.**  
Die N-Termini lagen acetyliert vor, die C-Termini als freie Säuregruppe.

Bezeichnung	Sequenz
N-Peptid	ELAGLLENPTNLEGKLADAEIIIILEGEDTQASLNWS
L4	STFRVGRKQLLSSAFVPLIGEK
L8	ARISRGRSIREFILG
L8 <i>random</i>	LIIGAESGRSRIRFR
L10	ADSASTVMGTMSQHGQLEANKWVTA

Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 3.12 gezeigt. Die C252T Leerprobe (Proteoliposomen ohne Peptid) zeigte das typische BetP-Regulationsprofil, wobei die Transportrate bei externer Osmolalität von 0,8 osmol/kg etwas stärker abfiel als gewöhnlich beobachtet. Ein Überschuss der Peptide L8 *random* oder L10 hatte keinen Einfluss auf die BetP-Regulation. Die internen Kontrollen waren somit wie erwartet negativ. L4 hatte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die BetP-Regulation. Hier fiel die maximale Rate zwar etwas geringer aus als bei der Leerprobe, die Form der BetP-Aktivierungskurve war aber nicht beeinträchtigt. Ein intraproteoliposomaler Überschuss an L8 und N-Peptid bewirkte hingegen eine drastische Veränderung des Aktivierungsprofils. Die maximale Transportrate wurden hier schon bei 0,4 osmol/kg erreicht und lagen mit etwa 500 nmol/min \* mg Protein um mehr als Faktor zwei unter jener der Leerprobe. Bei weiterer Erhöhung der externen Osmolalität blieben die Raten jeweils konstant.

Durch diese Konkurrenzexperimente konnten Daten aus den *peptide array* Experimenten teilweise verifiziert werden. Damit wurden Hinweise erhalten, dass die C-terminale BetP-Domäne mit der N-terminalen BetP-Extension, sowie mit der cytoplasmatischen Schleife 8 im Regulationsmechanismus interagiert. Eine Bedeutung von Schleife 4 konnte nicht untermauert werden.



**Abbildung 3.12: Transportaktivität von BetP C252T in Abhängigkeit der externen Osmolalität in Proteoliposomen aus *E. coli* Lipiden, welche mit Peptid im 10fach molaren Überschuss (Peptid:BetP) bezogen auf das interne Volumen beladen wurden.** Interner Puffer: 100 mM KP<sub>i</sub>; externer Puffer: 25 NaP<sub>i</sub>; 25 mM NaCl NaP<sub>i</sub>. Die Osmolalität wurde durch Zugabe von Prolin eingestellt. BetP C252T Aktivität in Proteoliposomen ohne Peptid ■ bzw. beladen mit (A) N-dom ●; L4 ★; L8 ▲ oder (B) L8r (*random*) ○; L10 △.

### 3.4.2 Interaktionen der BetP-Extensionen mit Lipidoberflächen

Das Regulationsverhalten des BetP-Transporters wird von der Kopfgruppensammensetzung der umgebenden Membran beeinflusst. Bei steigendem Anteil negativ geladener Kopfgruppen steigt die Aktivierungsschwelle und somit die für die Aktivierung benötigte Kaliumkonzentration an (Rübenhagen, 2001). Außerdem wird der Effekt von Aminosäuresubstitutionen in der putativen C-terminalen Sensordomäne auf die BetP-Regulation von der Membranumgebung moduliert (Schiller *et al.*, 2006 und s. Abschnitt 3.1). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass eine direkte Interaktion zwischen dem Kaliumsensor und der Membran stattfindet. Daher wurde die Interaktion der isolierten C-Domäne mit verschiedenen Lipidoberflächen mittels *surface-plasmon-resonance*-(SPR)-Spektroskopie untersucht. Die C-Domäne wurde als GST-Fusionsprotein in *E. coli* BL21 synthetisiert. Das Fusionsprotein wurde mittels Glutathion-Affinitätschromatographie gereinigt und die C-Domäne über eine spezifische Proteaseschnittstelle vom GST-Protein getrennt. Auch N-terminal deletierte BetP-Varianten zeigten eine membranabhängige Regulation. Daher wurde auch die Interaktion der N-Extension mit Lipiden untersucht. Hierzu stand ein synthetisches Peptid zur Verfügung, welches der Aminosäuresequenz des membranständigen Bereiches der N-Extension entsprach (Reste 28-64).

Für die SPR-Studien (Gerät: Biacore 3000) wurden vier verschiedene Lipidoberflächen verwendet: ein DOPE/DOPC-Gemisch (Mischungsverhältnis: 50:50), DOPE/DOPC +1/3DOPG, DOPE/DOPC+2/3DOPG und *E. coli* Lipidextrakt. DOPE/DOPC sollte als Kontrolloberfläche dienen, hier wurde die geringste Interaktion erwartet. *E. coli* Lipide wurden verwendet, da diese auch *in vivo* (Zellen) bzw. *in vitro* (Proteoliposomen) als Membranumgebung bei der Charakterisierung von BetP Verwendung finden. Durch Beimischung von DOPG zum DOPE/DOPC-Gemisch sollte eine *C. glutamicum* ähnliche Lipidoberfläche erzeugt werden. Die Verwendung von 100% DOPG war aus technischen Gründen nicht möglich.

Die Lipide wurden in Form von Liposomen mit einem Durchmesser von 100 nm auf einen L1 Chip (Firma Biacore) aufgezogen. Die Kopplung erfolgt hier über hydrophobe Anker-moleküle auf dem Chip. Nach einer Interaktionsmessung mit der BetP-Domäne konnte die Oberfläche durch Waschschrirte mit NaOH, HCl oder Hochsalzpuffer nicht vollständig regeneriert werden. Das heißt, es blieb jeweils Restprotein an der Oberfläche haften. Um für alle Messungen gleiche Bedingungen gewährleisten zu können, musste daher für jede Interaktionsmessung eine neue Liposomenoberfläche erzeugt werden. Tabelle 3.4 zeigt die Mittelwerte der gekoppelten *response units* aus sechs verschiedenen Liposomenkopplungen. Die *response units* sind direkt proportional zur

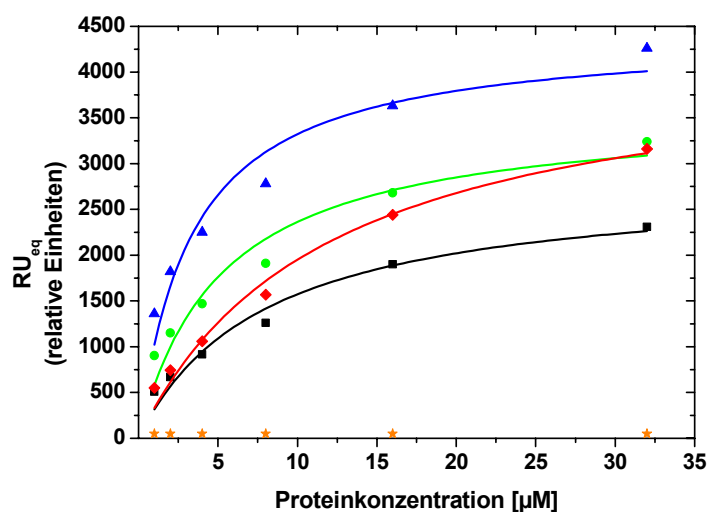
gekoppelten Masse auf dem Chip. In allen Fällen konnte gute Kopplungseffizienzen erzielt werden. Die Kopplungseffizienzen einer einzelnen Lipidvariante in verschiedenen Kopplungen unterlagen nur geringen Schwankungen, wodurch für alle Einzelexperimente vergleichbare Oberflächen vorhanden waren. Beim Vergleich der Kopplungen unterschiedlicher Liposomengemische fällt auf, dass die Kopplung bei DOPE/DOPC am besten war und mit zunehmendem DOPG-Gehalt abnahm. Dies ist dadurch zu begründen, dass es zu elektrostatischen Abstoßungen zwischen den PG-Kopfgruppen untereinander und den Kopfgruppen mit den hydrophoben Ankern auf dem Chip kommt (Anderluh *et al.*, 2005). Die schlechteste Kopplungseffizienz war bei *E. coli* Lipiden zu verzeichnen.

**Tabelle 3.4: Kopplungseffizienzen für Liposomen verschiedener Zusammensetzungen auf einen Biacore®-L1 Chip.** Für die Kopplung wurden je 25 µl Liposomensuspension einer Konzentration von 0,33 mg/ml Lipid mit einer Flussrate von 5 µl/min in das System injiziert. Kopplungspuffer: 50 mM Tris, pH 7,5; 150 mM KCl. Angegeben sind die Mittelwerte/Standardabweichungen der gekoppelten Einheiten (*response units* = RU) aus je sechs Kopplungen sowie die relativ gekoppelten RU-Werte bezogen auf den DOPE/DOPC-Wert.

Lipidoberfläche	RU gekoppelt (relative Einheiten)		
	absolut		% relativ zu DOPE/PC
<b>DOPE/DOPC</b>	9200	± 169	100
<b><i>E. coli</i></b>	6445	± 49	70
<b>DOPE/DOPC + 1/3 PG</b>	8244	± 300	90
<b>DOPE/DOPC + 2/3 PG</b>	7403	± 85	80

In den Interaktionsexperimenten wurden Proteinproben verschiedener Konzentrationen über die Lipidoberflächen gegeben. Die Ergebnisse aus den Interaktionsstudien sind in Abbildung 3.13 gezeigt. Dargestellt sind die RU-Werte im Gleichgewicht der Reaktion in Abhängigkeit der eingesetzten Proteinkonzentration. Hieraus konnte dann die Dissoziationskonstante  $K_d$  als Maß für die Affinität der Bindung über den halbmaximalen RU-Wert im Reaktionsgleichgewicht bestimmt werden („Gleichgewichts-Affinitäts-Analyse“; siehe auch Abschnitt 2.6). Eine direkte Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten für Assoziation ( $k_a$ ) und Dissoziation ( $k_d$ ) war nicht möglich. Ein kritischer Punkt der durchgeführten Messungen war, dass es sich bei der Interaktion zwischen der C-Domäne mit den Lipiden nicht um eine 1:1 Interaktion handelt, wie es zum Beispiel aus der Zellbiologie bekannt ist, wenn bei der Vesikelbildung Adapterproteine über eine spezifische Bindetasche an Phosphoinositolphosphate binden (Roth, 2004). Bei der BetP-

C-Domäne-Lipid-Interaktion liegt sehr wahrscheinlich eher eine relativ großflächige Interaktion vor, dadurch war eine direkte kinetische Auswertung mit der verwendeten Software nicht möglich. Außerdem konnte dadurch die Anzahl der Bindestellen auf der Lipidoberfläche nicht optimiert werden. Wenn zu viele Bindestellen vorhanden sind, kommt es zusätzlich zu so genannten *rebinding*-Effekten, was bedeutet, dass dissoziierendes Protein sofort wieder binden kann. Diese Effekte könnten die Ursache für die schlechte Dissoziation der C-Domäne von den Lipidoberflächen und demzufolge für die schwere Auswertbarkeit der Daten gewesen sein.



**Abbildung 3.13: Gleichgewichts-Affinitäts-Analyse für die Interaktion der BetP-C-Domäne sowie des N-Peptides mit verschiedenen Liposomenoberflächen.** Die im Reaktionsgleichgewicht erreichten RU-Werte sind als Funktion der Proteinkonzentration aufgetragen. Pufferbedingungen: 50 mM Tris, pH 7,5; 150 mM KCl. Die Sättigungskurven wurden mit der Software BIA-Evaluation gefittet. Interaktionen der C-Domäne mit: DOPE/DOPC ■; *E. coli* Lipiden ♦ ; DOPE/DOPC + 1/3 DOPG ● ; DOPE/DOPC + 2/3 DOPG ▲. Das N-Peptid interagiert mit keiner der Lipidoberflächen ★.

**Tabelle 3.5: Affinität der C-Domäne zu verschiedenen Lipidoberflächen.** Die  $K_d$  und  $RU_{max}$ -Werte wurden aus denen in Abbildung 3.13 gezeigten Daten mit der Software BIA-Evaluation gefittet. \*Die  $RU_{max}$  Werte wurden durch die relativen Kopplungseffizienzen (s. Tabelle 3.4) dividiert und somit normiert auf die DOPE/DOPC Oberfläche.

Lipidoberfläche	$K_d$ [µM]	$RU_{max}$ *
DOPE/DOPC	7,96	2830
DOPE/DOPC + 1/3 PG	5,98	3788
DOPE/DOPC + 2/3 PG	3,32	5702
<i>E. coli</i>	11,9	5764

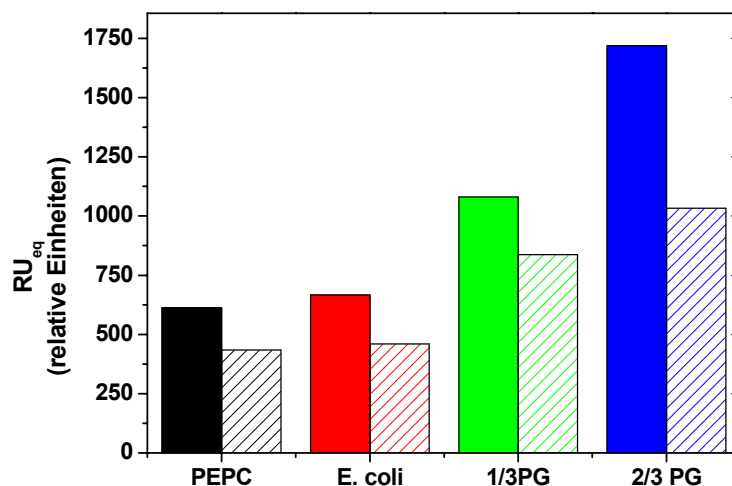


Für das N-Peptid konnte mit keiner Lipidoberfläche eine Interaktion detektiert werden. Die ermittelten  $K_d$ -Werte für die Interaktionen der C-Extension mit den Lipidoberflächen sind in Tabelle 3.5 angegeben. Die C-Extension interagiert mit allen vier Oberflächen und die  $K_d$ -Werte lagen jeweils im mikromolaren Bereich. Da auch eine signifikante Interaktion mit der DOPE/DOPC Oberfläche stattfand, wurden die DOPE/DOPC-Werte nicht als Referenz von den übrigen abgezogen, sondern sind als Vergleichswerte zu sehen. Inwiefern die Interaktion mit der DOPE/DOPC-Oberfläche unspezifisch war, kann leider nicht beurteilt werden. Klar erkenntlich ist die Tendenz, dass die Affinität der C-Extension mit dem Anteil an negativ geladenem PG zunahm. Ebenso nahmen die  $RU_{max}$  Werte mit steigendem PG-Anteil zu. Dies lag daran, dass wahrscheinlich elektrostatische Wechselwirkungen für die Interaktion der positiv geladenen C-Domäne mit den negativ geladenen PG-Lipiden von Bedeutung sind, so dass bei einem höheren PG-Anteil insgesamt auch mehr Bindestellen auf der Oberfläche zur Verfügung standen. Unerwartet war, dass die Affinität der C-Domäne zur *E. coli* Lipidoberfläche geringer ausfiel als zur DOPE/DOPC-Oberfläche, denn laut Herstellerangaben sollte die verwendete Lipidcharge 22% negativ geladene Lipide (PG+Cardiolipin) enthalten. Möglicherweise spielten hier Proteinverunreinigungen im Lipidextrakt eine Rolle. Diese konnten durch die Analyse von Liposomenproben mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Grundsätzlich kann hier festgehalten werden, dass durch die SPR-Studien die Interaktion der isolierten C-Domäne mit verschiedenen Lipidoberflächen direkt nachgewiesen wurde. Zudem konnte ein Zusammenhang zwischen der Interaktionsstärke und dem PG-Gehalt synthetischer Lipidoberflächen beobachtet werden.

*Peptide arrays* und Konkurrenzexperimente hatten Hinweise geliefert, dass eine Interaktion von C- und N-Domäne bei der osmostressabhängigen Aktivierung von BetP von Bedeutung ist. Eine direkte Untersuchung dieser Interaktion mittels SPR war im Rahmen dieser Arbeit nicht realisierbar. Daher wurde ein indirektes Experiment benutzt, um eine Interaktion zwischen der C-Domäne und der N-Domäne zu belegen. Es wurde untersucht, welchen Einfluss die Gegenwart des N-Peptides auf die Interaktion der C-Domäne hat. Hierzu wurde in einem Fall nur die C-Domäne über die Lipidoberfläche gegeben. Im anderen Fall wurde die C-Domäne zuvor mit einem 100fachen Überschuss an N-Peptid vorinkubiert. Abbildung 3.14 zeigt die ermittelten RU-Werte im Reaktionsgleichgewicht. Es ist klar ersichtlich, dass die Gegenwart des N-Peptides den RU-Wert reduzierte. Der gleiche Effekt in abgeschwächter Form konnte auch bei 10fachem Überschuss an N-Peptid beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Das

Experiment lässt zwar keine Aussage über eine veränderte Affinität der C-Domäne zu den Lipiden zu, aber die Gegenwart des N-Peptides kommt quantitativ einer verminderten Konzentration der C-Domäne gleich. Mit anderen Worten: Das N-Peptid scheint mit den Lipiden um die Interaktion mit der C-Domäne zu konkurrieren. Dieses Experiment kann, wenn auch nicht als direkter Nachweis, dennoch als weiterer indirekter Hinweis für eine C-Domäne - N-Domäne Interaktion gewertet werden.



**Abbildung 3.14: Einfluss des N-Peptides auf die Interaktion der C-Domäne mit Lipidoberflächen.** Dargestellt sind die RU-Werte im Reaktionsgleichgewicht nach Injektion von 2 μM C-Domäne (volle Flächen) bzw. 2 μM C-Domäne, die zuvor mit 100fach molarem Überschuss an N-Peptid (15 Minuten, RT) inkubiert wurden (schraffierte Flächen). Pufferbedingungen: 50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM KCl.

### 3.5 Untersuchung des Kaliumstimulus in lebenden Zellen

BetP wird in Proteoliposomen spezifisch durch die Erhöhung der intraliposomalen Kaliumkonzentration stimuliert. Andere potentielle Faktoren, die Osmostress anzeigen könnten, konnten im *in vitro* System als Stimulus zur Aktivierung von BetP ausgeschlossen werden (Rübenhagen, 2001; Schiller, 2004). Die Übertragbarkeit der *in vitro* Daten auf die *in vivo* Situation war jedoch bislang nicht gezeigt worden. Kürzlich wurde beobachtet, dass *C. glutamicum* in der Lage ist, in kaliumfreiem Minimalmedium eine begrenzte Zeit zu wachsen und dass sich hierbei der K<sup>+</sup>-Gehalt der Zellen je nach Kultivierungsdauer um bis zu Faktor zehn verringert. Außerdem konnten zwei Kaliumaufnahmesysteme in *C. glutamicum* identifiziert und deletiert werden (Becker, 2007). Auf dieser Basis wurden im letzten Teil der vorliegenden Arbeit Methoden etabliert,

die es erlaubten, die BetP-Stimulierung erstmals unter verschiedenen Kaliumkonzentrationen in lebenden Zellen zu untersuchen.

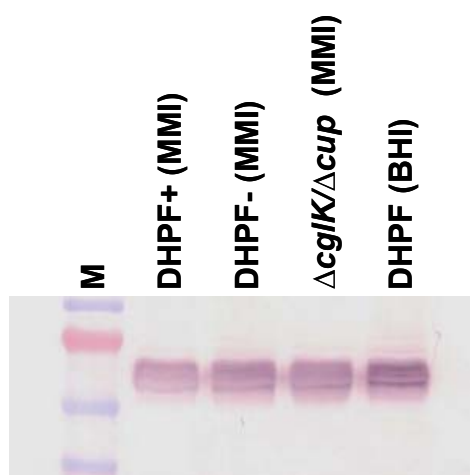
Die BetP-Aktivität wurde in Zellen bestimmt, die in An- oder Abwesenheit von Kalium kultiviert beziehungsweise osmotisch geschockt wurden. Durch die Etablierung von radiochemischen Aufnahmemessungen mit  $^{86}\text{Rb}^+$  konnte hierbei die Veränderung des intrazellulären „Kaliumgehaltes“ während der BetP-Aktivierung verfolgt werden. Auf Grund der ähnlichen Ionenradien können die meisten biologischen Systeme nicht zwischen Rubidium- und Kaliumionen unterscheiden. So wird BetP auch in Proteoliposomen durch Rubidium aktiviert (Schiller, 2004). Daher kann in biochemischen assays  $\text{K}^+$  durch  $\text{Rb}^+$  ersetzt werden. Die Messungen wurden mit drei verschiedenen Kulturen durchgeführt: 1) mit *C. glutamicum* DHPF Zellen, die über Nacht mit Kalium kultiviert worden waren, 2) mit *C. glutamicum* DHPF Zellen, die über Nacht ohne Kalium kultiviert worden waren, 3) mit der Doppelmutante  $\Delta\text{cglK}/\Delta\text{kup}$ , in der die beiden für *C. glutamicum* bekannten  $\text{K}^+$ -Aufnahmesysteme deletiert sind. Nachstehend werden diese drei Kulturen folgendermaßen benannt:

- DHPF-: ohne Kalium kultiviert
- DHPF+: mit Kalium kultiviert
- $\Delta\text{cglK}/\Delta\text{kup}$ : ohne Kalium kultiviert.

In allen drei Kulturen wurde *betP* mit Hilfe des Vektors pXMJ19 exprimiert. Folgende Daten wurden für diese drei Kulturen erhoben:

- 1) Die *betP* Expression wurde mittels Western Blot Analyse nachgewiesen.
- 2) Nachdem die Zellen einer Übernachtskultur in kaliumfreiem Puffer gewaschen worden waren, wurde die interne Kaliumkonzentration sowie die  $\text{K}^+$ -Konzentration im Überstand flammphotometrisch bestimmt.
- 3) Die BetP-Aktivität wurde unter iso- und hyperosmolaren Bedingungen jeweils mit und ohne Zugabe von externem Rubidium in radiochemischen Transportmessungen über die Zeit verfolgt.
- 4) Die Aufnahme von radioaktivem Rubidium ( $^{86}\text{Rb}^+$ ) wurde unter iso- und hyperosmolaren Bedingungen über einen Zeitraum von mehreren Minuten verfolgt.

Die Western Blot Analyse (Abbildung 3.15) zeigte, dass der Einbau von BetP in die Plasmamembran unabhängig von den Anzuchtbedingungen war. Überall konnten vergleichbare BetP-Mengen nachgewiesen werden. Unterschiedliche BetP-Mengen konnten also als Ursache für verschiedene Aktivitätshöhen ausgeschlossen werden.



**Abbildung 3.15: Western Blot Analyse der Synthese von BetP C252T in *C. glutamicum* Zellen:** DHPF+: nach Kultivierung in MMI-Medium; DHPF-: nach Kultivierung in kaliumfreiem MMI-Medium;  $\Delta cgIK/\Delta kup$ : nach Kultivierung in kaliumfreiem MMI-Medium. Zum Vergleich ist eine Probe nach Kultivierung von DHPF in BHI-Medium gezeigt. Für den Western Blot erfolgte die Zellanzucht und Induktion in gleicher Weise wie für die Transportmessungen. Isolierte Membranen wurden über SDS-PAGE (12,5%) nach Laemmli getrennt (je 40  $\mu$ g Gesamtprotein). Die BetP-Proteine wurden durch polyklonale Antikörper nachgewiesen. M: Proteinmarker; Molekulargewichte der Markerbanden von oben nach unten, beginnend mit der roten Bande (Angaben in kDa): 72, 55, 40. In allen Proben konnten vergleichbare BetP-Mengen nachgewiesen werden.

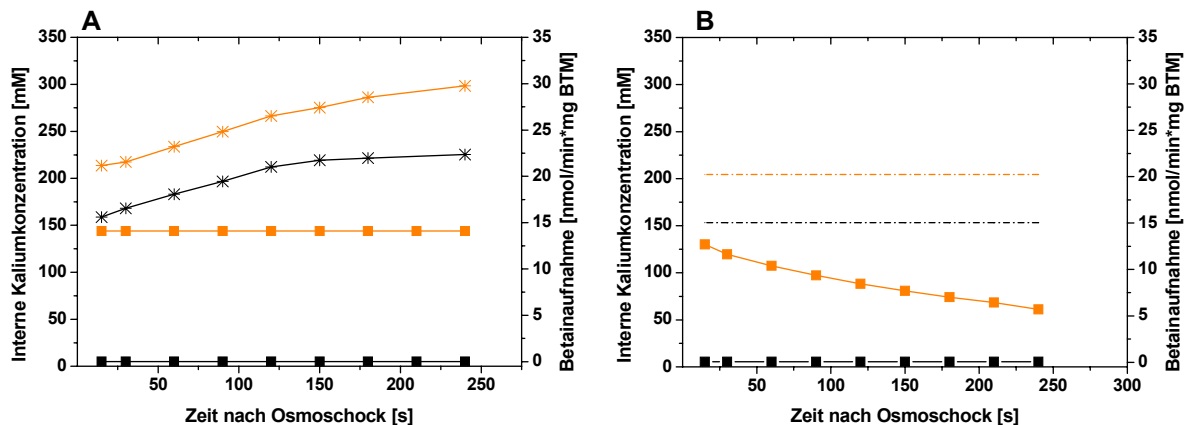
**Tabelle 3.6: Flammphotometrische Bestimmung der intrazellulären  $K^+$ -Konzentrationen bzw. der  $K^+$ -Konzentration im Überstand von *C. glutamicum* Zellen.** Die Kultivierung erfolgte über Nacht in MMI-Medium mit Kalium (DHPF+) oder ohne Kalium (DHPF- und  $\Delta cgIK/\Delta kup$ ). Die Zellen wurden in  $K^+$ -freiem Puffer gewaschen. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschallbehandlung. Die Berechnung der internen Konzentrationen erfolgte auf Grundlage der angegebenen Umrechnungsfaktoren für BTM und Volumen. Der Umrechnungsfaktor für das Volumen stammt aus Botzenhardt, 2004.

Kultur	$K^+$ extern [ $\mu$ M]	$K^+$ intern [mM]	Volumen-Faktor [ $\mu$ l <sub>int</sub> /mg <sub>BTM</sub> ]	BTM-Faktor [mg/ml*OD]
DHPF+	90 $\pm$ 4	153 $\pm$ 5	1,6	0,46
DHPF-	20 $\pm$ 1	23 $\pm$ 1	1,6	0,35
$\Delta cgIK/\Delta kup$	9 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	1,6	0,34

Die Ergebnisse aus den flammphotometrischen Messungen sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst. Für die Berechnung der internen Kaliumkonzentrationen  $[K^+]_{int}$  aus den Rohdaten, welche nur die absoluten Kaliummengen angeben, musste das cytoplasmatische Volumen bekannt sein. Da Volumenbestimmungen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr realisiert werden konnten, wurde der in einer früheren Arbeit gemessene Umrechnungsfaktor von 1,6  $\mu\text{l}/\text{mg}$  Biotrockenmasse verwendet. Dieser war für in MMI-Medium kultivierte DHPF Zellen bestimmt worden (Botzenhardt, 2004). Die Umrechnungsfaktoren von  $OD_{600}$  in Biotrockenmasse (BTM) für die verschiedenen Kulturen wurden experimentell ermittelt und entsprechend in der Rechnung berücksichtigt. Für die DHPF+ Zellen konnte eine  $[K^+]_{int}$  von 153 mM ermittelt werden. *C. glutamicum* hat normalerweise unter Standardanzuchtbedingungen eine  $[K^+]_{int}$  von 250-300 mM (Becker, 2007). Durch Waschen in  $K^+$ -freiem Puffer verloren die Zellen jedoch einen Teil des internen  $K^+$ , was an der externen  $K^+$ -Konzentration von 90  $\mu\text{M}$  erkennbar ist. Die externe Verunreinigung von 90  $\mu\text{M}$  wurde bei nachfolgenden radiochemischen  $Rb^+$ -Aufnahmemessungen in der spezifischen Aktivität berücksichtigt. Für die  $K^+$ -gehungerten Zellen (DHPF-) wurde eine interne  $K^+$ -Konzentration von 20 mM ermittelt. Die Doppelmutante  $\Delta cgIK/\Delta kup$  Mutante hatte intern nur 9 mM  $K^+$ .

Diese mit verschiedenen  $K^+$ -Mengen vorbeladenen Zellen konnten nun für BetP-Aktivitätsmessungen und  $Rb^+$ -Aufnahmemessungen verwendet werden. Die Ergebnisse aus diesen Messungen sind in den (Abbildungen 3.16-18) zu sehen. Gezeigt sind jeweils die Daten aus einer repräsentativen Messung. Dargestellt sind die interne Kaliumkonzentration und die Betainaufnahmerate in Abhängigkeit der Zeit nach dem Start der Messung, bei dem die Zellen entweder isoosmolaren oder hyperosmolaren Bedingungen ausgesetzt wurden. Zur Berechnung der internen Kaliumkonzentrationen wurde die Menge an aufgenommenem  $^{86}Rb^+$  zu der flammphotometrisch bestimmten  $K^+$ -Anfangsmenge hinzugerechnet. In Kontrollmessungen wurde durch Variation der spezifischen Aktivität gezeigt, dass  $Rb^+$  und  $K^+$  von *C. glutamicum* gleich gut aufgenommen werden. So konnte die Aufnahme von  $^{86}Rb^+$  durch Zugabe von  $K^+$  kompetitiert werden, wobei sich die Menge an aufgenommenem  $^{86}Rb^+$  stets um den gleichen Faktor verringerte, um welchen die spezifische Aktivität durch die  $K^+$ -Zugabe herabgesetzt worden war (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurde gezeigt, dass das Verhalten von BetP unabhängig davon war, ob extern  $Rb^+$  oder  $K^+$  zugesetzt wurden (Daten nicht gezeigt). Hiermit war sichergestellt, dass die Gleichsetzung von  $Rb^+$  und  $K^+$  bei der Datenauswertung zulässig war. Zur Vereinfachung wird im Folgenden der Begriff Kaliumkonzentration verwendet, auch wenn es sich um eine Mischung aus  $Rb^+$  und  $K^+$

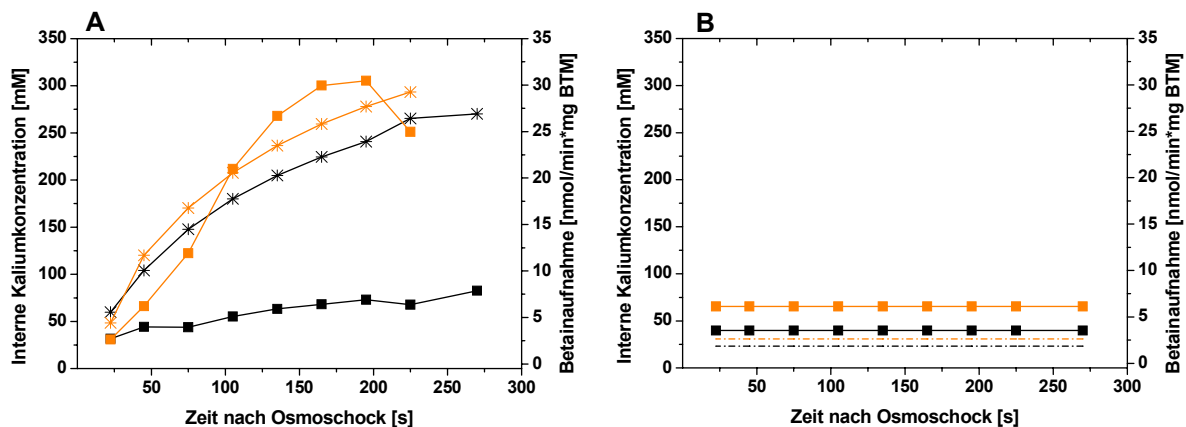
handelte. Volumen- und BTM-Umrechnungsfaktoren wurden wie in Tabelle 3.6 angegeben berücksichtigt. Unter hyperosmolaren Bedingungen verringert sich das cytoplasmatische Volumen auf Grund des osmotisch induzierten Wasserverlustes. Dieses osmotische Schrumpfen wurde mit dem Faktor 0,75 berücksichtigt. Dieser Wert wurde aus Daten früherer Volumenmessungen abgeleitet, bei denen die Versuchsbedingungen vergleichbar mit den hier vorliegenden Bedingungen waren (Botzenhardt, 2004).



**Abbildung 3.16: BetP-Aktivität und intrazelluläre K<sup>+</sup>-Konzentration in Abhängigkeit der Zeit nach Osmoschock in kaliumvorbeladenen *C. glutamicum* DHPF<sup>+</sup> Zellen.** BetP-Aktivität: ■ ; intrazelluläre K<sup>+</sup> Konzentration: \*. Externer Puffer: 25 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7,5; 100 mM NaCl (Osmolalität 0,24 osmol/kg, schwarze Symbole). Die Osmolalität von 1,2 osmol/kg wurde durch Zugabe von Sorbitol eingestellt (orange Symbole). Für die Betainaufnahmemessungen wurden 250 μM [<sup>14</sup>C]-Glycinbetain zugegeben. Die Messungen wurden jeweils durch Zugabe von Zellen gestartet. **(A)** Es wurden 2,5 mM RbCl (<sup>85</sup>RbCl (■, ■) oder <sup>86</sup>RbCl (\*, \*) extern zugegeben. Die K<sup>+</sup>-Konzentration wurde über die Menge an aufgenommenem <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> und flammphotometrisch bestimmten Ausgangskonzentrationen (Rechnung s. o.) berechnet. **(B)** Es wurde kein RbCl extern zugegeben. Es wurde angenommen, dass die vor dem Experiment vorliegende interne K<sup>+</sup>-Konzentration konstant bleibt (unterbrochene Linie, schwarz) beziehungsweise sofort nach Applikation des hyperosmotischen Schocks konzentriert wird und dann unverändert blieb (unterbrochene Linie, orange).

Abbildung 3.16A zeigt die Ergebnisse für die Kultur DHPF<sup>+</sup>, also für die kaliumvorbeladenen Zellen. Hier wurden jeweils beim Start der Messung extern 2,5 mM RbCl zugesetzt. Die Rubidiumaufnahme war unabhängig von der osmotischen Stresssituation. Rb<sup>+</sup> wurde in beiden Fällen - also unter iso- und unter hyperosmotischen Bedingungen - mit vergleichbarer Geschwindigkeit aufgenommen, wobei die Aufnahme unter isoosmotischen Bedingungen etwas früher abflachte. Unter isoosmotischen Bedingungen lag die erreichte Endkonzentration bei circa 225 mM. Unter hyperosmotischen Bedingungen betrug die interne K<sup>+</sup>-Konzentration nach 4 Minuten etwa 275 mM. Unabhängig vom osmotischen Stress schienen hier die Zellen in beiden Fällen

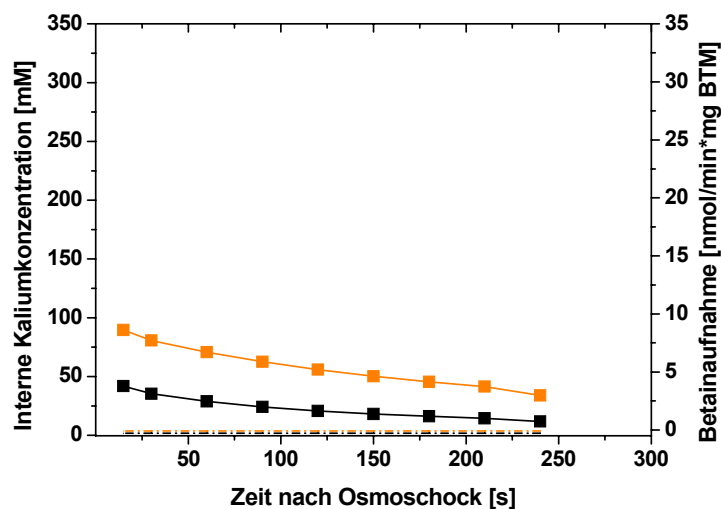
das durch die Waschschritte verursachte  $K^+$ -Defizit auszugleichen und ihre physiologische  $[K^+]_{int}$  wieder einzustellen. Die Bestimmung der BetP-Aktivität in identisch behandelten DHPF+ Zellen belegte, dass BetP unter isoosmotischen Bedingungen inaktiv war. Bei einem hyperosmotischen Schock wurde BetP sofort aktiviert und die Rate blieb mit circa 14 nmol/min \* mg BTM über den aufgenommenen Zeitraum konstant. Eine Zunahme der internen  $K^+$ -Konzentration löste also keine weitere Zunahme der BetP-Aktivität aus. Abbildung 3.16B zeigt den gleichen Versuch allerdings ohne Zugabe von externem RbCl. Daher wurde hier angenommen, dass die interne Kaliumkonzentration konstant bleibt. Dies wurde aber nicht experimentell überprüft. Unter isoosmotischen Bedingungen war BetP auch hier inaktiv. Nach osmotischem Schock war BetP zunächst maximal aktiviert, mit einer ähnlichen Rate wie in  $K^+$ -vorbelaenen Zellen, dann sank die Rate leicht ab.



**Abbildung 3.17: BetP-Aktivität und intrazelluläre  $K^+$ -Konzentration in Abhängigkeit der Zeit nach Osmoschock in kaliumverarmten *C. glutamicum* (DHPF-) Zellen.** BetP-Aktivität: ■ ; intrazelluläre  $K^+$  Konzentration: \*. Externer Puffer: 25 mM  $NaP_i$ , pH 7,5; 100 mM NaCl (Osmolalität 0,24 osmol/kg, schwarze Symbole). Die Osmolalität von 1,2 osmol/kg wurde durch Zugabe von Sorbitol eingestellt (orange Symbole). Für die Betainaufnahmemessungen wurden 250  $\mu M$  [ $^{14}C$ ]-Glycinbetain zugegeben. Die Messungen wurden jeweils durch Zugabe von Zellen gestartet. **(A)** Es wurden 2,5 mM RbCl ( $^{85}RbCl$  (■, ■) oder  $^{86}RbCl$  (\*, \*)) extern zugegeben. Die  $K^+$ -Konzentration wurde über die Menge an aufgenommenem  $^{86}Rb^+$  und flammphotometrisch bestimmten Ausgangskonzentrationen (Rechnung s. o.) berechnet. **(B)** Es wurde kein RbCl extern zugegeben. Es wurde angenommen, dass die vor dem Experiment vorliegende interne  $K^+$ -Konzentration konstant bleibt (unterbrochene Linie, schwarz) beziehungsweise sofort nach Applikation des hyperosmotischen Schocks konzentriert wird und dann unverändert blieb (unterbrochene Linie, orange).

Die Ergebnisse aus den Messungen mit kaliumverarmten Zellen sind in Abbildung 3.17 gezeigt. Abbildung A zeigt wieder das Experiment mit externer Zugabe von 2,5 mM  $Rb^+$ . Auch hier war die Aufnahme von  $Rb^+$  unabhängig von den osmotischen Bedingungen. Die kaliumgehungerten Zellen glichen also ihr  $K^+$ -Defizit aus. Nach 4 Minuten lagen die  $K^+$ -

Konzentrationen bei 250 und 275 mM. In identisch behandelten Zellen zeigte BetP ohne osmotischen Stress eine Basisaktivität von 2 nmol/min \* mg BTM, die dann innerhalb von vier Minuten leicht auf bis zu circa 7 nmol/min \* mg BTM anstieg. Nach einem hyperosmotischen Schock war zunächst eine geringe BetP-Basisaktivität zu verzeichnen. Dann nahm die BetP-Rate stark zu und wurde nach drei Minuten mit circa 30 nmol/min \* mg BTM maximal. Die BetP-Aktivierungskurve nahm hier einen leicht sigmoidalen Verlauf. Obwohl die  $K^+$ -Konzentrationen in beiden Fällen ähnlich waren, wurde BetP also nur unter hyperosmotischen Bedingungen aktiviert. Abbildung 3.17B zeigt den gleichen Versuch ohne Zugabe von  $Rb^+$ . Es konnte also angenommen werden, dass die interne Kaliumkonzentration unverändert bleibt. Hier zeigte BetP unter isoosmotischen Bedingungen eine über die Zeit konstante Basisaktivität von etwa 3 nmol/min \* mg BTM. Mit osmotischem Schock lag die Rate bei knapp 7 nmol/min \* mg BTM und blieb ebenfalls über den aufgenommenen Zeitraum unverändert. Durch den osmotischen Schock kam es also zu einer leichten Basisstimulierung. Eine volle BetP-Stimulierung wie sie in Abbildung 3.17A zu sehen ist trat aber nicht auf, wenn kein  $Rb^+$  zur Aufnahme zur Verfügung stand.

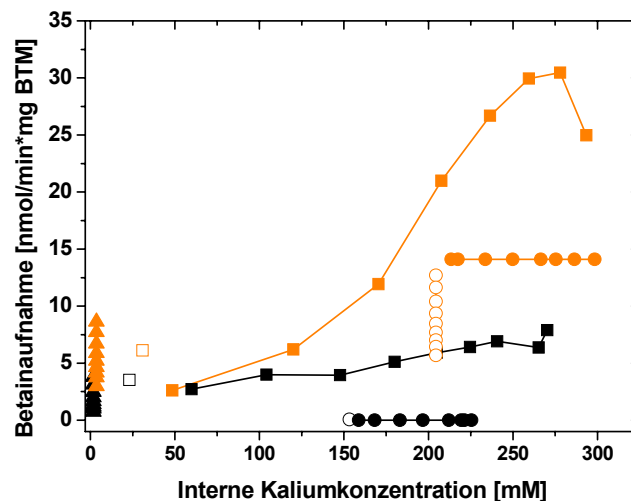


**Abbildung 3.18: BetP-Aktivität und intrazelluläre  $K^+$ -Konzentration in Abhängigkeit der Zeit nach Osmoschock in *C. glutamicum*  $\Delta cglK/\Delta kup$  Zellen.** BetP-Aktivität: ■ ; intrazelluläre  $K^+$  Konzentration: unterbrochene Linie. Externer Puffer: 25 mM  $NaP_i$ , pH 7,5; 100 mM  $NaCl$  (Osmolalität 0,24 osmol/kg, schwarze Symbole). Die Osmolalität von 1,2 osmol/kg wurde durch Zugabe von Sorbitol eingestellt (orange Symbole). Es wurden 2,5 mM  $RbCl$  ( $^{86}RbCl$  (■, ■) oder  $^{86}RbCl$  (unterbrochene Linie)) extern zugegeben. Für die Betainaufnahmemessungen wurden 250  $\mu M$  [ $^{14}C$ ]-Glycinbetain zugegeben. Die Betainaufnahme über EctP wurde durch Zugabe von 25 mM Ectoin kompetitiert. Die Messungen wurden jeweils durch Zugabe von Zellen gestartet. Da kein  $^{86}Rb^+$  aufgenommen wurde, wurde angenommen, dass die vor dem Experiment vorliegende interne  $K^+$ -Konzentration konstant bleibt (unterbrochene Linie, schwarz) beziehungsweise sofort nach Applikation des hyperosmotischen Schocks konzentriert wird und dann unverändert blieb (unterbrochene Linie, orange).



In dem in Abbildung 3.18 gezeigten Experiment wurden die gleichen Messungen mit dem Stamm *C. glutamicum*  $\Delta cglK/\Delta kup$  durchgeführt. Dieser Stamm war bisher noch nicht biochemisch charakterisiert. Die radiochemischen Transportmessungen belegten, dass diese Doppelmutante bei einer externen Konzentration von 2,5 mM nicht mehr in der Lage war  $Rb^+$  aufzunehmen. Mit und ohne Zugabe von externem  $Rb^+$ , war hier das Verhalten von BetP identisch, daher sind nur die Daten mit Zugabe von  $RbCl$  gezeigt. Ohne osmotische Stimulierung konnte hier ähnlich wie in  $K^+$ -gehungerten DHPF Zellen eine Basisaktivität von circa 3 nmol/min\*mg BTM verzeichnet werden. Diese nahm jedoch im Verlauf des Versuchs ab. Auch hier konnte BetP durch die Applikation eines hyperosmotischen Schocks leicht stimuliert werden. Unter hyperosmotischen Bedingungen betrug die BetP-Rate zunächst 8 nmol/min\*mg BTM und sank dann aber auf 3 nmol/min\*mg BTM ab.

In Abbildung 3.19 sind alle zuvor gezeigten Daten nochmals zusammengefasst. Um die Abhängigkeit der BetP-Rate von der internen  $K^+$ -Konzentration zu analysieren, wurde hier jeweils die BetP-Rate zu einem bestimmten Zeitpunkt gegen die zellinterne Kaliumkonzentration zu diesem Zeitpunkt aufgetragen. Hier erkennt man, dass die volle Stimulierung von BetP in kaliumverarmten Zellen von der Aufnahme von  $Rb^+$  aus dem Medium abhing (vergleiche  $\square$  und  $\blacksquare$ ). Die Zunahme der BetP-Aktivität korrelierte mit einem Anstieg der  $[K^+]_{int}$  von 60 mM auf 275 mM. In diesem  $K^+$ -Konzentrationsbereich wird BetP auch in Proteoliposomen aktiviert (Rübenhagen, 2001). Auffällig ist jedoch, dass BetP im selben  $K^+$ -Konzentrationsbereich nur marginal aktiviert wurde, wenn isoosmotische Bedingungen vorlagen ( $\blacksquare$ ). Die Erhöhung der internen  $K^+$ -Konzentration alleine war also nicht ausreichend für eine BetP-Stimulierung. Den gleichen Hinweis lieferte das Verhalten von BetP in  $K^+$ -vorbeladenen Zellen. Unter isoosmotischen Bedingungen war BetP hier in einem Konzentrationsbereich von 150-225 mM inaktiv ( $\bullet$ ). Unter hyperosmotischen reichten hingegen knapp 220 mM  $K^+$  aus um BetP voll zu stimulieren ( $\bullet$ ). Als wichtiger Punkt kann hier also festgehalten werden, dass BetP nur voll aktiv war, wenn hohe Kaliumkonzentrationen und hyperosmotische Bedingungen vorlagen. Darüber hinaus fällt auf, dass in kaliumverarmten Zellen eine geringe osmoabhängige Basisstimulierung auftrat (vergleiche  $\blacktriangle$  mit  $\triangle$ ;  $\square$  mit  $\square$ ). Diese musste kaliumunabhängig sein, da hier nur sehr geringe Kaliumkonzentrationen vorlagen (kleiner 50 mM).



**Abbildung 3.19: BetP-Aktivität in Abhängigkeit der intrazellulären Kaliumkonzentration:** kaliumvorbeladene *C. glutamicum* Zellen (DHPF+) (○;●), kaliumverarmte Zellen (DHPF-)(■;□) und kaliumtransportdefiziente Zellen ( $\Delta cglK/\Delta kup$ ) (▲). Die Werte sind aus denen in Abbildung 3.16-3.18 gezeigten Daten abgeleitet. Schwarze Symbole: Isoosmolare Bedingungen (0,24 osmol/kg). Orange Symbole: Hyperosmolare Bedingungen (1,2 osmol/kg). Offene Symbole: Es wurde extern kein RbCl zugegeben. Geschlossene Symbole: Es wurden extern 2,5 mM RbCl hinzugegeben.

Der Vollständigkeit halber seien hier noch zwei auffällige Beobachtungen erläutert. Zum einen fiel auf, dass die BetP-Aufnahmerate in  $K^+$  vorbeladenen Zellen nicht stabil war, wenn den Zellen kein externes Rubidium zur Aufnahme zur Verfügung stand (○). Hierfür gibt es keine offensichtliche Erklärung. Im Prinzip wäre es möglich, dass die DHPF+ Zellen Kalium verloren, weil sie zum Versuchsstart in  $K^+$ -freiem Puffer verdünnt wurden. Der intrazelluläre Kaliumgehalt nach Versuchsstart wurde nicht experimentell überprüft. So könnte das Absinken der BetP-Aktivität direkt mit einem Absinken der internen  $K^+$ -Konzentration zusammen gegangen haben. Das scheint jedoch nicht plausibel. Denn diese abnehmende BetP-Aufnahmerate wurde auch in den  $\Delta cglK/\Delta kup$  Zellen beobachtet (▲), die ohnehin nur eine minimale interne  $K^+$ -Konzentration hatten. Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass unter der doppelten Stressbelastung (Kaliummangel und hyperosmotischer Schock) die Energetik der Zelle beeinträchtigt war und das für die BetP-Aktivität benötigte Natriumpotential absank. Eine direkte Beeinträchtigung des Natriumpotentials durch den hyperosmotischen Schock konnte aber ausgeschlossen werden, da Sorbitol und nicht NaCl für die Einstellung der Osmolalität des Schockpuffers verwendet wurde. Außerdem trat das Absinken der BetP-Aktivität in den DHPF- Zellen nicht auf (siehe □), obwohl auch hier Kaliummangel und hyperosmotischer Stress zu gleich vorlagen. Die Erklärung für das Absinken der BetP-Rate bleibt also offen.

Der zweite auffällige Punkt war, dass die maximale BetP-Rate in DHPF+ Zellen immer deutlich unter der maximalen BetP-Rate in DHPF- Zellen lag. Auch dies lässt sich nicht genau erklären. Ein direkter Zusammenhang mit Kalium erscheint unwahrscheinlich. Es ist anzumerken, dass die BetP-Rate bei in Minimalmedium gezogenen Zellen immer geringer ausfiel als bei in BHI-Medium kultivierten Zellen (vgl. Abschnitt 3.1), obwohl die Expression gleich gut war. Die maximale BetP-Aktivität betreffend gibt es hier also ein prinzipiell unverstandenes Problem. Ein Vergleich der absoluten Raten scheint also nur innerhalb derselben Kultur sinnvoll.

Trotz dieser beiden ungeklärten Effekte können für die Untersuchungen zur Kaliumabhängigkeit der BetP-Aktivität in lebenden Zellen vier entscheidende Punkte zusammengefasst werden: 1) Die osmotische Aktivierung von BetP in  $K^+$ -gehungerten Zellen korrelierte zeitlich mit der Aufnahme von  $Rb^+$ . 2) In  $K^+$ -vorbeladenen Zellen war BetP sofort nach Osmoschock voll aktiv. 3) In  $K^+$ -verarmten Zellen war auch ohne osmotische Stimulierung eine geringe BetP-Aktivität zu verzeichnen und unter hyperosmotischen Bedingungen kam es hier bei klein bleibenden  $[K^+]_{int}$  zu einer geringen BetP-Stimulierung. 4) Unter isoosmotischen Bedingungen konnte BetP durch hohe  $K^+$ -Konzentrationen nicht aktiviert werden.

## 4 Diskussion

Für eine schnelle Stressantwort unter hyperosmotischen Bedingungen sind Bakterien mit osmoregulierten Aufnahmesystemen für kompatible Solute ausgestattet. Die Vereinigung katalytischer Aktivität mit sensorischen und regulatorischen Fähigkeiten im gleichen Protein stellt hierbei einen besonders effektiven Regulationsmechanismus dar und wurde bislang für drei bakterielle Transporter nachgewiesen. Diese sind ProP aus *E. coli*, OpuA aus *L. lactis* und BetP aus *C. glutamicum* (Racher *et al.*, 1999; Rübenhagen *et al.*, 2000; van der Heide und Poolman, 2000b). Die Identifizierung der aktivierenden Stimuli ist mittlerweile für alle drei Transporter gelungen (van der heide *et al.*, 2001; Rübenhagen *et al.*, 2001; Culham *et al.*, 2003; Wood, 2006), die genauen mechanistischen Vorgänge bei Detektion und Transduktion der aktivierenden Signale sind jedoch noch immer weitgehend unverstanden.

In dieser Arbeit wurde der Regulationsmechanismus des Osmosensors und Osmoregulators BetP aus *Corynebacterium glutamicum* untersucht. Nachdem durch funktionale Rekonstitution in Proteoliposomen gezeigt worden war, dass BetP eine erhöhte proteoliposomale Kaliumionenkonzentration als aktivierenden Stimulus detektiert und so seine Transportaktivität reguliert (Rübenhagen *et al.*, 2001; Schiller *et al.*, 2004a), wurde in einem Projekt dieser Arbeit untersucht, inwiefern Kalium auch in lebenden Zellen als BetP-Stimulus fungiert. Des Weiteren war im Vorfeld der Arbeit bekannt, dass die cytoplasmatisch gelegene C-terminale Extension von BetP für die Aktivitätsregulation essentiell ist und dass die Kopfgruppenzusammensetzung der BetP umgebenden Membran den Regulationsmechanismus moduliert (Schiller, 2004). Hier wurde nun im Detail analysiert, welche Bedeutung die  $\alpha$ -helikale Konformation der C-terminalen Domäne für den BetP-Regulationsmechanismus hat und wie diese von der Membrenumgebung beeinflusst wird. Darüber hinaus wurde das Interaktionsverhalten der C-terminalen Domäne charakterisiert. Interaktionen der C-Domäne mit der Membran oder mit anderen Proteinbereichen könnten sowohl für eine direkte Kaliumdetektion als auch eine indirekte Signaltransduktionsfunktion von Bedeutung und so in den BetP-Regulationsmechanismus eingebunden sein.

### ***In vivo* ist Kalium notwendig aber nicht hinreichend für die BetP-Aktivierung**

Ein Osmosensor ist in der Lage osmotischen Stress selbstständig zu detektieren und seine Aktivität in Abhängigkeit des vorliegenden Stresses zu regulieren (Wood, 1999). Die Beantwortung der Frage, welches Signal genau hierbei von einem Osmosensor

wahrgenommen wird, ist entscheidend, um den Regulationsmechanismus eines Osmosensors verstehen zu können. Sämtliche bisher vorliegenden Erkenntnisse über die von Osmosensoren detektieren Stimuli wurden durch Messungen im artifizialen Proteoliposomensystem gewonnen (vgl. Tabelle 1.3). Da jedoch in diesem System nicht alle potentiellen Stimuli für einen Osmosensor erfasst werden können (wie zum Beispiel der Turgor oder *macromolecular crowding*), stellt sich die Frage nach der Übertragbarkeit der Daten aus Proteoliposomenmessungen auf lebende Zellen. Dies ist bislang für keinen Osmosensor gelungen. Die *in vivo* Verifizierung der *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse muss langfristiges Ziel für die Analyse aller Osmosensoren sein. Bei einem hyperosmotischen Schock verändern sich im zellulären System normalerweise alle als Stimuli in Frage kommenden Parameter synchron (Wood, 1999), deshalb müssen Methoden etabliert werden, die es erlauben, verschiedene Stimuli gezielt und separat voneinander zu verändern. Des Weiteren müssen genaue Messmethoden zur *in vivo* Quantifizierung der als Reize in Frage kommenden Parameter zur Verfügung stehen. In dieser Arbeit wurde ein erster Schritt in diese Richtung für den Osmosensor BetP gemacht. In Proteoliposomen wird BetP spezifisch durch Kaliumionen sowie durch  $\text{Rb}^+$  und  $\text{Cs}^+$ , die einen ähnlichen Ionenradius wie  $\text{K}^+$  haben, aktiviert (Schiller, 2004a). Kalium erscheint prinzipiell auch *in vivo* als Stimulus für einen Osmosensor sinnvoll, denn zum einen ist Kalium das dominierende Kation im Cytoplasma und wird durch das Schrumpfen der Zelle unter hyperosmotischen Bedingungen sofort weiter konzentriert (Wood, 1999; Botzenhardt, 2004), zum anderen wurde in verschiedenen Bakterien die aktive Aufnahme von Kaliumionen als erste schnelle Antwort auf hyperosmotischen Stress nachgewiesen (Epstein, 1986; Whatmore *et al.*, 1990). Neben BetP ist allerdings bisher kein Osmosensor bekannt, der *in vitro* spezifisch auf Kalium reagiert. Jedoch wurde für den ABC-Transporter und Osmosensor OpuA aus *L. lactis*, der über eine erhöhte interne Ionenstärke aktiviert wird, beschrieben, dass dieser in Proteoliposomen durch  $\text{K}^+$  stärker stimuliert wird als durch andere monovalente Kationen (Mahmood *et al.*, 2006). Bereits 2001 wurde von Jung *et al.* ähnliches für die Sensorhistidinkinase EnvZ des Zweikomponentensystems EnvZ/OmpR publiziert, welches in *E. coli* in die Osmostressantwort involviert ist. Eine stärkere Aktivierung durch  $\text{K}^+$  im Vergleich zu anderen Kationen wurde auch für den Osmosensor MtrB aus *C. glutamicum*, ebenfalls eine Sensorhistidinkinase, beschrieben (Möker *et al.*, 2007a). Jedoch wurde von Möker *et al.* gezeigt, dass die Sensorhistidinkinase DcuS aus *E. coli*, welche nicht in die Osmostressantwort involviert ist, ebenfalls durch  $\text{K}^+$  stärker aktiviert wird als durch andere monovalente Kationen. Daraus wurde postuliert, dass die *in vitro* beobachtete kaliumabhängige Aktivierung von Zweikomponentensystemen keine physiologische

Relevanz hat (Möker *et al.*, 2007a). Diese Beobachtungen machen eine *in vivo* Verifizierung der K<sup>+</sup>-spezifischen BetP-Stimulierung umso spannender.

Bezüglich einer osmotisch induzierten K<sup>+</sup>-Aufnahme gibt es in *C. glutamicum* widersprüchliche Ergebnisse. Es gibt sowohl Hinweise auf die Akkumulation von K<sup>+</sup> als auch auf die Akkumulation von Na<sup>+</sup> als unmittelbare hyperosmotische Stressantwort (Guillouet und Engasser, 1995; Wolf *et al.*, 2003). Die gesamte Kaliumhomöostase sowie Kaliumtransportprozesse sind in *C. glutamicum* noch nicht im Detail verstanden. Es konnte jedoch kürzlich gezeigt werden, dass *C. glutamicum* in der Lage ist, in kaliumfreiem Medium eine begrenzte Zeit zu wachsen, sodass sich hierbei die interne Kaliumkonzentration von normalerweise 250-300 mM auf circa 20-50 mM verringert. Außerdem wurden zwei Kaliumaufnahmesysteme genetisch identifiziert und deletiert. Hierbei handelt es sich sehr wahrscheinlich um einen passiven Kaliumkanal, codiert durch *cgIK*, und um einen Kup-verwandten Kalium/Protonen Symporter (Becker, 2007). Die Doppelmutante  $\Delta cgIK/\Delta kup$  hatte nach Kultivierung in K<sup>+</sup>-freiem MMI-Medium interne K<sup>+</sup>-Konzentrationen von unter 10 mM (Becker, 2007). Mit dieser Doppelmutanten und der K<sup>+</sup>-freien Kultivierungsmethode für den Wildtyp standen nun erstmals Mittel zur Verfügung, um die BetP-Aktivität bei verschiedenen Kaliumkonzentrationen *in vivo* zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zusätzlich radiochemische Transportmessungen mit <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> etabliert, wodurch es möglich war, Veränderungen des intrazellulären Kaliumgehaltes unter verschiedenen Bedingungen zu verfolgen. Hierbei wurde angenommen, dass die Aufnahme von <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> der K<sup>+</sup>-Aufnahme gleichgesetzt werden kann, da von allen bekannten K<sup>+</sup>-Aufnahmesystemen nur der Kdp-Transporter zwischen K<sup>+</sup> und Rb<sup>+</sup> diskriminieren kann und in *C. glutamicum* kein Kdp-System vorhanden ist (Stumpe *et al.*, 1996; Schrader *et al.* 2000; Becker, 2007). Die durchgeführten Messungen wiesen nicht auf eine osmotisch induzierte Akkumulation von K<sup>+</sup> hin, denn in allen Messungen war der Import von Rb<sup>+</sup> unter iso- und unter hyperosmotischen Bedingungen vergleichbar. Weil *C. glutamicum* weder ein Trk- noch ein Kdp- noch ein Ktr-System zur Kaliumaufnahme besitzt, welche in *E. coli* und *B. subtilis* osmoabhängig aktiviert werden (Epstein *et al.*, 2003; Holtmann *et al.*, 2003), stellt sich also die Frage, ob eine K<sup>+</sup>-Akkumulation überhaupt bei *C. glutamicum* in die Osmostressantwort involviert ist. Diese Problematik wurde aber in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt, da die Untersuchung einer osmotisch induzierten K<sup>+</sup>-Akkumulation nicht im direkten Focus der Arbeit lag.

Die Untersuchung der BetP-Aktivierung bei unterschiedlichen internen Kaliumkonzentrationen lieferte verschiedene Hinweise darauf, dass die BetP-Aktivierung auch *in vivo* von Kalium abhängt. In Zellen, die in Anwesenheit von Kalium kultiviert worden waren, war BetP unmittelbar nach einem hyperosmotischen Schock voll aktiv.

Flammphotometrische Messungen belegten, dass diese Zellen zum Zeitpunkt vor der Applikation des osmotischen Schocks eine interne Kaliumkonzentration von etwa 150 mM hatten, welche sich durch osmotisches Schrumpfen unmittelbar nach dem Schock auf circa 200 mM erhöhen sollte. Die Berechnung der Konzentration erfolgte hierbei auf Basis der in einer früheren Arbeit bestimmten Umrechnungsfaktoren für das interne Zellvolumen unter isoosmotischen und hyperosmotischen Bedingungen (Botzenhardt, 2004). Stand diesen Zellen zum Start des Experimentes externes  $\text{Rb}^+$  zur Verfügung, so wurde dieses aufgenommen. Dies konnte durch radiochemische Transportmessungen belegt werden. Durch diese Erhöhung der internen  $\text{Rb}^+/\text{K}^+$ -Konzentration wurde aber die BetP-Aktivität nicht weiter stimuliert. Eine Konzentration von 200 mM  $\text{K}^+$  reichte also für die volle BetP-Aktivierung aus. Interessanterweise verlief die BetP-Aktivierung ganz anders, wenn kaliumverarmte Zellen (DHPF-) osmotisch geschockt wurden und hierbei extern  $\text{Rb}^+$  zur Aufnahme zugegeben wurde. Hier war die BetP-Rate zunächst gering und stieg dann über einen Zeitraum von drei Minuten signifikant an. Diese Aktivierung korrelierte mit einem durch  $\text{Rb}^+$ -Aufnahme bedingten Anstieg der  $\text{Rb}^+/\text{K}^+$ -Konzentration von 25 auf knapp 300 mM. Dies erscheint zunächst als Widerspruch zu der Beobachtung, dass in  $\text{K}^+$ -vorbeladenen Zellen die BetP-Aktivität oberhalb von 200 mM nicht weiter anstieg. Hierfür können aber leichte Ungenauigkeiten in der Volumenberechnung die Ursache sein. Der ungefähre Schwellenwert zur Aktivierung lag in den DHPF- Zellen bei 150-200 mM. Ungefähr in diesem  $\text{K}^+$ -Konzentrationsbereich wird BetP auch in Proteoliposomen aus *E. coli* Lipiden aktiviert. Bei einem Gehalt von 50% DOPG in den Liposomen, also in einer *C. glutamicum* ähnlichen Lipidumgebung, fällt die Aktivierungsschwelle *in vitro* allerdings etwas höher aus (Rübenhagen, 2001).

Die Tatsache, dass die Zunahme der BetP-Aktivität in den  $\text{K}^+$ -verarmten Zellen direkt mit der Aufnahme von  $\text{Rb}^+$  zusammenhängen musste, kann auch durch die Beobachtung belegt werden, dass diese Aktivierung nicht auftrat, wenn den geschockten Zellen kein externes Rubidium zur Verfügung stand oder wenn die identische Messung mit der  $\Delta\text{cglK}/\Delta\text{kup}$  Mutante durchgeführt wurde, die kein  $\text{Rb}^+$  aufnehmen konnte. Für den Osmosensor ProP aus *E. coli*, der *in vitro* nicht durch Kalium, sondern über seinen Hydratationsstatus aktiviert wird, wurde interessanterweise berichtet, dass die ProP-Aktivität *in vivo* ebenfalls von der externen Kaliumverfügbarkeit abhängt. Diese Abhängigkeit wurde aber dadurch begründet, dass Kalium bei osmotischem Stress für die Aufrechterhaltung der Protonenmotorischen Kraft (PMK) und somit für die Energetisierung des  $\text{H}^+$ -Prolin-Symportes benötigt wird (Meury *et al.*, 1994; MacMillan *et al.*, 1999; Wood, 2006). Da BetP das Natriumpotential und nicht die PMK als treibende Kraft nutzt, kann diese Erklärung nicht auf BetP übertragen werden. Es scheint unwahrscheinlich, dass das

Natriumpotential bei hyperosmotischen Stress und gleichzeitigem Kaliummangel beeinträchtigt wird, trotzdem sollte dies künftig noch experimentell überprüft werden. Eine Beeinträchtigung des  $\text{Na}^+$ -Potentials in *C. glutamicum* unter hyperosmotischen Bedingungen bei gleichzeitiger Kaliumverfügbarkeit konnte bereits ausgeschlossen werden (Botzenhardt, 2004).

Diese Daten belegten also zunächst, dass die BetP-Aktivierung in ganzen Zellen direkt von einer hohen internen  $\text{K}^+$ -Konzentration abhängt. Allerdings konnte eine diese nicht alleine für die BetP-Aktivität ausreichend sein. Denn sowohl in  $\text{K}^+$ -verarmten als auch in  $\text{K}^+$ -vorbeladenen DHPF-Zellen war die  $^*\text{Rb}^+$ -Aufnahmerate unter isoosmotischen und hyperosmotischen Bedingungen fast identisch. So wurden in beiden Kulturen auch unter isoosmotischen Bedingungen interne  $\text{K}^+$ -Konzentrationen von über 200 mM erreicht, bei denen BetP unter hyperosmotischen Bedingungen voll aktiv war. Unter isoosmotischen Bedingungen war BetP hier aber inaktiv. Dies impliziert die Frage, ob neben Kalium ein weiterer Faktor für die BetP-Aktivierung benötigt wird.

Bemerkenswert war auch der Vergleich des BetP-Verhaltens in  $\text{K}^+$ -vorbeladenen und  $\text{K}^+$ -verarmten Zellen unter isoosmotischen Bedingungen, wenn extern kein  $\text{Rb}^+/\text{K}^+$  vorhanden war. In den  $\text{K}^+$ -vorbeladenen Zellen war BetP gänzlich inaktiv, während der Transporter in  $\text{K}^+$ -verarmten Zellen eine sehr schwache Transportaktivität zeigte. Diese musste kaliumunabhängig sein, denn die interne  $\text{K}^+$ -Konzentration betrug hier nur etwa 20 mM, in den  $\text{K}^+$ -vorbeladenen Zellen aber 150 mM. Im Rahmen der Untersuchungen zum Kaliumtransport in *C. glutamicum* wurde ein Modell vorgeschlagen, nachdem das Bakterium unter Kaliummangelbedingungen verstärkt Ammonium aufnimmt, um den Ionenhaushalt der Zelle zu regulieren (Becker, 2007). Die  $\text{NH}_4^+$ -Konzentration wurde zwar nicht experimentell nachgewiesen, aber Ammonium war unter den gegebenen Anzuchtbedingungen neben  $\text{Na}^+$  das einzige in hohen Mengen verfügbare Kation und Natrium kann auf Grund seiner Toxizität als akkumuliertes Ersatzion ausgeschlossen werden. Es wäre möglich, dass die BetP-Basisaktivität in diesen Zellen durch eine erhöhte  $\text{NH}_4^+$ -Konzentration ausgelöst wird. Eine BetP-Aktivierung durch  $\text{NH}_4^+$ , welches einen ähnlichen Ionenradius besitzt wie  $\text{K}^+$ , konnte zwar in Proteoliposomen nicht direkt nachgewiesen, aber auf Grund seiner pH beeinträchtigenden Eigenschaft auch nicht eindeutig ausgeschlossen werden (Rübenhagen, 2001). In beiden kaliumverarmten Kulturen (DHPF ohne Kalium angezogen und  $\Delta\text{cglK}/\Delta\text{kup}$ ), das heißt bei geringen internen Kaliumkonzentrationen (kleiner als 50 mM), trat unter hyperosmotischen Bedingungen eine leichte BetP-Stimulierung auf. Es wäre möglich, dass diese Basisstimulierung durch die Konzentrierung des akkumulierten  $\text{K}^+$ -Ersatzions  $\text{NH}_4^+$  zu Stande kommt oder aber dass ein anderer  $\text{K}^+$ -unabhängiger Faktor BetP hier geringfügig stimuliert.



Ist Kalium nun auch *in vivo* der Stimulus für die BetP-Aktivierung? Die komplexen Effekte lassen sich in drei Aussagen zusammenfassen (siehe Tabelle 4.1): 1) Bei geringen internen K<sup>+</sup>-Konzentrationen tritt eine geringe osmostressinduzierte BetP-Stimulierung auf. 2) Ein hyperosmotischer Schock führt nur dann zur vollen BetP-Stimulierung, wenn eine hohe interne Kaliumkonzentration vorliegt. 3) Bei ähnlich hohen Kaliumkonzentrationen unter isoosmotischen Bedingungen wird BetP nicht stimuliert. In logischer Konsequenz bedeutet dies: Kalium ist notwendig aber nicht hinreichend für die BetP-Stimulierung. Neben Kalium muss es also noch einen zweiten BetP-aktivierenden Faktor geben, der *in vivo* unter hyperosmotischen Bedingungen auftritt. Dies könnte die schon seit langen diskutierte Frage erklären, warum BetP in Proteoliposomen bei K<sup>+</sup>-Konzentrationen aktiv ist, welche der physiologischen K<sup>+</sup>-Konzentration in nicht osmotisch geschockten Zellen entspricht. Allerdings ist hier zu berücksichtigen, dass ein Großteil des zellulären Kaliums (in *E. coli* knapp 60%) nicht frei, sondern gebunden an Makromoleküle vorliegt (Stumpe *et al.*, 1996).

**Tabelle 4.1: Korrelation der BetP-Aktivität mit der intrazellulären K<sup>+</sup>-Konzentration unter isoosmolaren und hyperosmolaren Bedingungen.** Die Aktivitäten in % beziehen sich auf die unter der jeweiligen Anzuchtbedingung (das heißt mit oder ohne Kalium) maximal erreichte BetP-Aktivität. Symbolik für interne Kaliumkonzentrationen: + ≥150mM; ++ ≥200mM ; - <50mM; ↑: Anstieg der Rate/Konzentration im Verlauf des Experimentes auf den angegebenen Wert/Bereich.

Zellen	...osmolar	[K <sup>+</sup> ] <sub>int</sub>	BetP-Aktivität [%]
DHPF (K <sup>+</sup> -vorbeladen)	iso	+↑++	0
	hyper	++↑	100
DHPF (K <sup>+</sup> -verarmt)	iso	- ↑++	5↑20
	hyper	-	20
	hyper	- ↑++	5 ↑ 100
Δ <i>cglK</i> /Δ <i>kup</i> (K <sup>+</sup> -verarmt)	iso	-	5
	hyper	-	20

Welche Faktoren kommen als zweiter *in vivo* Stimulus in Frage? Prinzipiell müssen die Parameter in Erwägung gezogen werden, die im Proteoliposomensystem nicht erfasst wurden. Als ein Stimulus, der über das Cytoplasma auf BetP übertragen würde, käme hier *macromolecular crowding* in Frage (Garner und Burg, 1994). Die Effekte von Makromolekülen auf Proteine können in artifiziellen Systemen nur schwer imitiert werden. Eine Möglichkeit stellt jedoch die Verwendung von langkettigen Polyethylenglykolen

(PEGs) dar, welche im Falle von BetP aber nicht getestet wurden. Die Osmosensoren MtrB und ProP konnten in Proteoliposomen durch PEGs aktiviert werden. In beiden Fällen wurde letztlich der Hydratationsstatus der Proteine als Stimulus postuliert (Culham *et al.*, 2000; Wood, 2006; Möker *et al.*, 2007b). Dies kann für BetP jedoch ausgeschlossen werden, da verschiedene Osmolyte sowie unterschiedliche Ionen nicht stimulierend auf BetP wirkten, die alle auch den Hydratationsstatus von BetP beeinflussen (Rübenhagen, 2001). Wahrscheinlicher erscheint es, dass der zweite unbekannte BetP-Stimulus direkt über die Membran auf den Transporter übertragen wird. Hier käme der reduzierte Turgor oder die durch osmotisches Schrumpfen hervorgerufene laterale Membranspannung in Frage. Der Einfluss des Turgors wurde bislang auf Grund seiner schwierigen Messbarkeit für kaum einen Osmosensor untersucht. Jedoch konnte kürzlich für die Sensorkinase KdpD über die Bestimmung des Cytoplasmavolumens ein reduzierter Turgor als Stimulus ausgeschlossen werden (Hamann *et al.*, 2008). Die Membranspannung ist als Stimulus für mechanosensitive Kanäle bekannt (Sukharev *et al.*, 2002; Jeon und Voth, 2008). Zwar konnte in Proteoliposomen ausgeschlossen werden, dass BetP durch Schrumpfen der Liposomen aktiviert wird (Rübenhagen, 2001), jedoch sind die mechanischen Verhältnisse in der Liposomenmembran auf Grund der fehlenden Zellwand im *in vitro* System anders als *in vivo*. Es existieren verschiedene Hinweise darauf, dass die Membran einen direkten Einfluss auf die BetP-Aktivierung hat. So wirkte das Lokalanästhetikum Tetracain, welches die intrinsische Membranspannung verändert, stimulierend auf BetP (Steger, 2002). Außerdem wird für die Kälteaktivierung von BetP, welche K<sup>+</sup>-unabhängig ist, der Membranzustand als BetP-Stimulus diskutiert (Özcan *et al.*, 2005, 2007). Interessanterweise wurde in diesem Zusammenhang kürzlich beobachtet, dass ein erhöhter Anteil an ungesättigten Fettsäuren in der *C. glutamicum* Membran neben der Kälteaktivierung auch die Osmoregulation von BetP stören kann (Henrich, 2008). Alles in allem scheint es also plausibel, dass der zweite putative Stimulus bei der osmoabhängigen Aktivierung über die Membran auf BetP übertragen werden könnte, womit erstmalig Anhaltspunkte für eine Überschneidung der BetP-Aktivierungsmechanismen unter Kältestress und osmotischem Stress existieren.

Die These, dass es in Zellen neben Kalium einen zweiten osmotischen Stimulus für BetP gibt, wirft die Frage auf, warum BetP dann in Proteoliposomen nur durch Kalium stimuliert werden kann. Da nicht quantitativ eingeschätzt werden kann, wann BetP in Liposomen zu 100% aktiviert ist, wäre es denkbar, dass es sich bei der dort erfassten Stimulierung nur um eine Basisstimulierung handelt, die sich bei zusätzlicher Applikation des zweiten Stimulus noch weiter erhöhen würde.

Die Gültigkeit des hier postulierten Modells für einen zweiten BetP-Stimulus steht und fällt mit der Richtigkeit des nach Botzenhardt 2004 eingeschätzten cytoplasmatischen Volumens unter iso- und hyperosmotischen Bedingungen, auf dessen Grundlage die internen Kaliumkonzentrationen berechnet wurden. Sollte das Schrumpfen des Cytoplasmas signifikant unterschätzt worden sein, so würden sich die unter hyper- und isoosmotischen Bedingungen auftretenden  $K^+$ -Konzentrationen nicht überschneiden und Kalium könnte durchaus als einziger Stimulus postuliert werden. Generell wird in der Literatur mehrfach beschrieben, dass sich das Zellvolumen bei hyperosmotischem Stress signifikant verändert. Das Ausmaß sowie der zeitliche Verlauf der Volumenänderungen variieren jedoch stark je nach Organismus und Versuchbedingungen (Blumwald *et al.*, 1983; Baldwin *et al.*, 1988; Rönsch *et al.*, 2003). Des Weiteren muss beachtet werden, dass sich bei *E. coli* die Zellgröße unter Kaliummangelbedingungen generell verringert (Hamann *et al.*, 2008). Hinweise hierauf gibt es auch für *C. glutamicum* Zellen (Martin Follmann, persönliche Mitteilung). Das hier vorgeschlagene Modell muss also künftig durch zuverlässige Volumenmessungen verifiziert werden, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnten. Prinzipiell sind die hier vorgelegten Daten aber schon zum jetzigen Zeitpunkt aus zweierlei Hinsicht hochinteressant. Einerseits konnte gezeigt werden, dass die BetP-Aktivierung prinzipiell auch in lebenden Zellen von Kalium abhängt, wodurch für einen Osmosensor erstmals *in vitro* gewonnene Daten *in vivo* verifiziert werden konnten. Andererseits bringt die mögliche Existenz eines zweiten Stimulus vollkommen neue Aspekte in das Modell für den BetP-Regulationsmechanismus vor allem unter dem Gesichtspunkt, dass die BetP-Aktivierung unter Kälte- und unter Osmostress *in vivo* durch einen ähnlichen Mechanismus ausgelöst werden könnten.

### **Proline in der C-terminalen $\alpha$ -Helix stören die BetP-Aktivitätsregulation**

BetP reguliert seine Aktivität in Abhängigkeit von hyperosmotischem Stress. Sowohl *in vitro* Daten als auch die in dieser Arbeit vorgelegten *in vivo* Daten belegen, dass BetP hierzu über cytoplasmatisch gelegene Proteinbereiche die Kaliumkonzentration als Maß für den osmotischen Stress detektiert (Rübenhagen *et al.*, 2001; Schiller *et al.*, 2004a). Durch verschieden lange Deletionen der cytoplasmatischen C-terminalen Domäne war im Vorfeld dieser Arbeit gezeigt worden, dass diese Domäne in die Kaliumsensorik des Carriers involviert ist (Schiller *et al.*, 2004b). Eine spezifische Kaliumbindestelle konnte jedoch nicht identifiziert werden. Es wurde kürzlich berichtet, dass eine C-terminale Deletion bei dem BetP Ortholog aus *E. coli*, BetT, interessanterweise ebenfalls zum Verlust der osmoregulatorischen Eigenschaften des Transporters führt (Tøndervik und Strøm, 2007). Gleiches ist auch für EctP aus *C. glutamicum* bekannt (Steger, 2002). Eine

regulatorische Funktion der C-Extension scheint also in der BCCT-Familie konserviert zu sein. Details zu den Regulationsmechanismen von BetT und EctP sind aber anders als für BetP nicht bekannt.

Die C-terminale BetP-Extension umfasst die Aminosäurereste 546-595 und ist überwiegend positiv geladen. Sowohl *in silico* Strukturvorhersagen als auch erste röntgenkristallographische Daten implizieren, dass die C-Extension ungefähr im Bereich der Aminosäurereste 550-590 eine  $\alpha$ -Helix ausbildet (Ressl, persönliche Mitteilung; *in silico* Strukturvorhersage Anhang 6.3).  $\alpha$ -Helices können durch Proline destabilisiert werden, weil ein Prolin auf Grund seiner sekundären Aminogruppe nicht die typischen Wasserstoffbrücken über sein Stickstoffatom mit der vier Positionen *upstream* gelegenen Aminosäure ausbilden kann und es durch seine zyklische Struktur weniger flexibel ist als andere Aminosäuren. In einer  $\alpha$ -Helix verursacht ein Prolin somit einen Knick um etwa  $26^\circ$  (Barlow *et al.*, 1988). In natürlichen  $\alpha$ -Helices fungiert ein solcher Knick häufig als strukturgebendes Element in Transmembrandomänen von Transportern zum Beispiel für die Ausbildung der Transportpore. Außerdem kann die *cis-trans* Isomerisierung der Peptidbindung des Prolins mit der N-terminalen Nachbaraminosäure Konformationsänderungen für den Transportprozess vermitteln (Deber und Therien, 2002). Die künstliche Einführung von Prolinen in  $\alpha$ -Helices kann hingegen eine funktional wichtige Proteindynamik stören. So wird für eine humane Hexokinase beschrieben, dass durch die Einführung eines Prolins in die  $\alpha$ -Helix, welche die katalytische und die regulatorische Domäne miteinander verbindet, die Signaltransduktion zwischen den beiden Domänen verhindert wird (Tsai, 2007).

Für die  $\alpha$ -helikale C-terminale BetP Domäne wurde im Vorfeld dieser Arbeit beobachtet, dass die Einführung eines Prolinrestes in einer vorderen und einer mittleren Position der Domäne den gleichen Effekt auf die BetP-Regulation auslöst, wie eine Deletion. Hieraus wurde abgeleitet, dass die  $\alpha$ -helikale Konformation oder die relative räumliche Orientierung der C-Extension für die Wahrnehmung der Kaliumkonzentration wichtig sind (Schiller *et al.*, 2006). Nachdem also erste BetP-Prolinmutanten auf eine Bedeutung der C-terminalen  $\alpha$ -Helix für die BetP-Regulation hingewiesen hatten, wurde in dieser Arbeit der Effekt des Helixbrechers Prolin innerhalb der BetP-C-Domäne detailliert untersucht. In dem hier durchgeführten Mutagenese-*screening* wurden siebzehn Aminosäurereste der C-Extension zwischen den Positionen E555 und R582 systematisch durch Prolin ersetzt. *In silico* Strukturanalysen belegten, dass diese Proline die Ausbildung einer  $\alpha$ -Helix im unmittelbar oberhalb der Prolinsubstitution gelegenen Bereich stören. Sollte die Kaliumsensorik oder Signaltransduktion von der relativen räumlichen Ausrichtung der C-Domäne abhängen, so war es denkbar, dass sich Regulationseffekte im Abstand von vier

Resten periodisch wiederholen würden, je nachdem auf welcher Seite der Helix das eingeführte Prolin positioniert ist und in welche Richtung die Domäne dementsprechend abgelenkt wird (Sekundärstrukturvorhersagen und *helical wheel* siehe Anhang 6.3, 6.4).

Die funktionale Charakterisierung der Prolinvarianten in *E. coli* Zellen ergab, dass die Varianten E555P bis K575P nicht osmotisch reguliert waren. Die Transportraten lagen auf Höhe der Basisaktivität der C252T Kontrolle und nahmen mit zunehmender externer Osmolalität leicht ab. Durch Messungen bei externen Osmolalitäten unterhalb von 0,24 osmol/kg konnte eine Stimulierung im niederosmolaren Bereich ausgeschlossen werden, die sich unter Standardbedingungen zwischen 0,24 osmol/kg und 0,4 osmol/kg angedeutet hatte. Ebenso führten weiter C-terminal gelegene Substitutionen (R576P, L578P, A580P) zu BetP-Varianten, die keine typische Regulation, sondern nur eine marginale osmotische Stimulierung zeigten. Die Variante R582P war hingegen normal osmotisch reguliert. Im vorderen und zentralen Bereich der putativen  $\alpha$ -Helix störte der Helixbrecher Prolin also den osmoregulatorischen Mechanismus des Transporters, während dieser Effekt abgeschwächt wurde beziehungsweise verschwand, wenn das Prolin näher in Richtung des C-Terminus rückte. In diesen Trend reiht sich auch die im Vorfeld dieser Arbeit charakterisierte Prolinmutante R584P ein, welche normal osmoreguliert war (Ott, 2005). Eine periodische Wiederholung von Effekten, über die im Vorhinein spekuliert worden war, gab es nicht.

Die in *E. coli* gewonnenen Daten des Prolin-scannings implizierten zunächst, dass die korrekte Konformation der C-terminalen  $\alpha$ -Helix bis zur Position L578 die Voraussetzung für eine funktionierende Kaliumdetektion respektive Signaltransduktion ist. Diese These wurde überprüft, indem innerhalb der C-terminalen  $\alpha$ -Helix Aminosäuresubstitutionen vorgenommen wurden, welche laut *in silico* Vorhersage die Struktur nicht stören (siehe Anhang 6.3). Die osmoregulatorische Analyse der Varianten in *E. coli* Zellen ergab, dass sowohl die Einführung, als auch die Eliminierung oder Umkehrung von Ladungen im zentralen Bereich der putativen Helix (Positionen E555, A564 und R568) die BetP-Regulation in gleicher Weise störten, wie der Helixbrecher Prolin. Gleiches war auch im Vorfeld für Substitutionen in der Position E572 beobachtet worden (Schiller, 2004). Im Gegensatz dazu beeinträchtigen Nicht-Prolinsubstitutionen in den peripheren Bereichen die BetP-Regulation weniger stark als Prolinsubstitutionen (Y550A; R576A und R576E) (Ott, 2005). Aus den Daten kann somit postuliert werden, dass die BetP-Regulation von einer intakten  $\alpha$ -Helix in den äußeren Bereichen der C-Extension abhängt. Im zentralen Bereich genügt hingegen die ungestörte Struktur der  $\alpha$ -Helix nicht, sondern hier scheint vielmehr die durch die Aminosäuresequenz vorgegebene Feinstruktur essentiell zu sein.

Die Regulation des Osmosensors ProP aus *E. coli* wird ebenfalls durch ein C-terminales  $\alpha$ -helikales Strukturmotiv beeinflusst. Bei ProP vermittelt die C-Extension die Homodimerisierung des Transporters über die Ausbildung eines antiparallelen *coiled-coil* Motives. Hierdurch wird die Aktivierungsschwelle von ProP vermindert. Die Dimerisierung kann hier durch die Eliminierung einer einzigen Ladung (R488I) gestört werden (Culham *et al.*, 2000, Hillar *et al.*, 2005; Tsatskis *et al.*, 2008). Für BetP belegen 2D- und 3D-Kristalle, dass der Transporter ein Homotrimer bildet (Ziegler *et al.*, 2004; Tsai, *et al.*, 2007, Christine Ziegler, persönliche Mitteilung). Da zur Herstellung der 2D-Kristalle die C-terminal deletierte BetP-Variante  $\Delta$ C45 verwendet wurde (Tsai *et al.*, 2007), kann eine C-Domäne vermittelte Oligomerisierung für BetP ausgeschlossen werden. Somit ist es nicht möglich, dass Regulationsdefekte der C-terminalen Mutanten mit einer veränderten Oligomerisierung von BetP zusammenhängen. Die Tatsache, dass die C-Domäne nicht direkt in die Trimerisierung des BetP-Proteins involviert ist, erlaubt ihr eine hohe Flexibilität, die für eine regulatorische Funktion benötigt wird.

### **Die negativen Kopfgruppen der Membranlipide stabilisieren die korrekte Konformation der C-Domäne**

Die Cytoplasmembranen von *E. coli* und *C. glutamicum* unterscheiden sich deutlich bezüglich ihrer Kopfgruppenzusammensetzung. Während die *C. glutamicum* Membran zu 100% negativ geladene Kopfgruppen besitzt (40% PG; 35% CL; 25% PI), machen die negativ geladenen Phospholipide in der *E. coli* Membran nur einen Anteil von 20% (PG + CL) aus. 80% der Phospholipide sind hier ungeladen (PE) (Özcan *et al.*, 2007; Romantsov *et al.*, 2007). Diese unterschiedlichen Membranzusammensetzungen haben einen großen Effekt auf die BetP-Regulation. So verschiebt sich im Vergleich zu *E. coli* Zellen in *C. glutamicum* der Schwellenwert zur BetP-Aktivierung zu höheren Osmolalitäten (Peter *et al.*, 1998a). Außerdem wurde beobachtet, dass verschiedene BetP-Varianten mit Aminosäuresubstitutionen in der Position E572 nur in *E. coli* nicht aber in *C. glutamicum* Zellen dereguliert waren. Mittels Proteoliposomen konnte gezeigt werden, dass diese Effekte direkt mit dem hohen PG-Anteil in der *C. glutamicum* Membran zusammenhängen, denn durch Erhöhung des PG-Anteils in Proteoliposomen aus *E. coli* Lipiden zeigte BetP eine verminderte Sensitivität gegenüber osmotischem Stress (Schiller *et al.*, 2006). In dieser Arbeit konnte zusätzlich bewiesen werden, dass das negativ geladene Phospholipid DOPS qualitativ den gleichen Effekt auf die Regulation von BetP ausübt wie DOPG. Hierdurch wurde belegt, dass die *in vivo* beobachteten Membraneffekte nicht spezifisch mit Phosphatidylglycerolkopfgruppen

zusammenhängen, sondern prinzipiell auf die negativen Ladungen der *C. glutamicum* Membranlipide zurückzuführen sind.

Auf Grund dieser Daten konnten nun die beiden Organismen *E. coli* und *C. glutamicum* als *screening*-Systeme für unterschiedliche Membranumgebungen verwendet werden. So wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die C-terminalen Mutanten sensitiv auf die Membranumgebung reagierten. Die Charakterisierung in *C. glutamicum* Zellen ergab, dass sowohl Prolinvarianten als auch die Nicht-Prolinvarianten mit Substitutionen im zentralen Bereich der C-Extension in der nativen Membranumgebung nicht oder nur schwach osmoreguliert waren (A564P, R565P, V569P, A564K, A564D). Diese Mutanten verhielten sich in *C. glutamicum* also ähnlich wie in der *E. coli* Membran. Dies war anders für Nicht-Prolinsubstitutionen im vorderen Bereich der C-Domäne. So war die Variante Y550A, welche in *E. coli* nur schwach osmoreguliert war, im homologen BetP-Organismus voll stimulierbar. Hier war die native Membranumgebung offensichtlich förderlich für einen funktionierenden Regulationsmechanismus des Transporters. Gleiches wurde beobachtet, wenn der negativ geladene Rest E555 durch ein neutrales Alanin ersetzt wurde. Eine Ladungsumkehrung in dieser Position (E555R) hatte hingegen in beiden Membranumgebungen einen nachhaltigen Effekt auf die BetP Regulation. Möglicherweise beeinträchtigte hier ein verändertes elektrostatisches Verhalten der C-Domäne die BetP-Regulation. Besonders interessant war das Regulationsverhalten der beiden Varianten K575P und R576P, in denen der Prolinaustausch im hinteren Bereich der putativen  $\alpha$ -Helix lag. Diese waren in *E. coli* Zellen gar nicht oder nur sehr schwach osmoreguliert, während sie in *C. glutamicum* Zellen voll stimulierbar waren. Im hinteren Bereich der  $\alpha$ -Helix konnten also auch durch Proline ausgelöste Regulationsdefekte durch die native Membranumgebung aufgehoben werden, somit war die Grenze zwischen regulierten und nicht regulierten Prolinmutanten deutlich in N-terminaler Richtung verschoben.

Die Effekte C-terminaler Aminosäuresubstitutionen auf die BetP-Regulation sind in Abbildung 4.1 nochmals schematisch zusammengefasst. Um das Bild zu komplettieren sind sowohl die Daten aus dieser Arbeit als auch Daten aus Schiller, 2004, und Ott, 2005, berücksichtigt. Auch wenn das Mutagenese-*scanning* nicht lückenlos durchgeführt wurde, lassen sich in der Gesamtheit der Daten im Wesentlichen drei Tendenzen erkennen: 1) In beiden Membranumgebungen können Prolinsubstitutionen die BetP-Regulation in einem breiteren C-terminalen Bereich stören als Nicht-Prolinsubstitutionen. 2) Der Bereich, in dem Nicht-Prolinsubstitutionen die Regulation beeinträchtigen, beschränkt sich in *C. glutamicum* auf einen schmaleren Bereich als in *E. coli* Zellen. 3) Die Region, in der ein Prolin den Regulationsmechanismus stört, ist in *C. glutamicum* Zellen im Vergleich zu *E. coli* Zellen C-terminal deutlich verkürzt.





diesem Bereich der Einfluss negativ geladener Membranlipide auf die BetP-Regulation (K575P; R675P) besonders stark ist.

Ein Einfluss der Lipidumgebung auf die Regulation wird auch für andere Osmosensoren berichtet. So zeigen genau wie BetP sowohl ProP aus *E. coli* als auch OpuA aus *L. lactis* eine erhöhte Aktivierungsschwelle bei steigendem Anteil negativ geladener Phospholipide (van der Heide *et al.*, 2001; Tsatskis *et al.*, 2005; Romantsov *et al.*, 2008). Im Falle der Sensorhistidinkinase MtrB aus *C. glutamicum* wurde hingegen der gegenteilige Effekt, nämlich die Verminderung der Aktivierungsschwelle in Abhängigkeit von POPG, gezeigt (Möker, 2006). Zudem wurde bei dem ABC-Transporter OpuA auch die membranabhängige Regulation einer C-terminalen Mutante beobachtet. Der Osmosensor OpuA detektiert sehr wahrscheinlich mit seiner C-terminalen CBS-Domäne der ATPase Untereinheit die interne Ionenstärke. Hier führte die Deletion des anionischen C-terminalen Fortsatzes zu einer OpuA-Variante, die in einer PG-reichen Membran eine höhere Aktivierungsschwelle besaß als in einer PG-armen Membran (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006b). Anders als bei den C-terminalen BetP-Varianten kann der Membraneffekt hier aber einfach über eine veränderte Nettoladung der mutierten C-Domäne begründet. Ebenso wird für ProP aus *E. coli* spekuliert, dass die C-terminale  $\alpha$ -helikale *coiled-coil* Domäne direkt von Membranlipiden beeinflusst wird. So verhindert hier eine Mutation des *coiled-coil* Motives die Co-Lokalisation des Transporters mit Cardiolipin, wodurch die Cardiolipin bedingte Erhöhung der Aktivierungsschwelle für ProP verschwindet (Romantsov *et al.*, 2008). Eine spezifische Co-Lokalisation mit bestimmten Membranlipiden kann für BetP im Prinzip ausgeschlossen werden. Zum einen treten in der *C. glutamicum* Membran anders als bei *E. coli* keine lokalen *cluster* bestimmter Lipide auf (Mileykovskaya und Dowhan, 2000; Marc Bramkamp, persönliche Mitteilung), zum anderen scheint eine Co-Lokalisation deshalb nicht sinnvoll, weil in *C. glutamicum* ohnehin alle Lipide negativ geladen sind (Özcan *et al.*, 2007).

### **Die C-terminale Domäne interagiert mit Lipidoberflächen**

Die Ergebnisse der C-terminalen Mutagenesestudien sprechen also dafür, dass in den Mechanismus der osmostressabhängigen Aktivierung von BetP eine Interaktion der C-terminalen BetP-Extension mit Membranlipiden involviert ist. Die beobachteten membranabhängigen Effekte auf das Regulationsverhalten C-terminaler BetP-Varianten können jedoch eine solche Interaktion nur indirekt belegen. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit das Interaktionsverhalten der isolierten C-Extension mit verschiedenen Lipidoberflächen mittels Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) direkt analysiert. Durch die SPR-Studien konnte gezeigt werden, dass die isolierte C-Domäne

sowohl mit reinen ungeladenen als auch negativ geladenen Lipidoberflächen interagiert. Zur quantitativen Beschreibung der Interaktionen wurden die Dissoziationskonstanten  $K_d$  indirekt durch Gleichgewichts-Affinitäts-Analyse bestimmt. Der ermittelte  $K_d$  Wert für eine reine DOPE/DOPC Oberfläche lag bei 7,96  $\mu\text{M}$ . Mit steigendem Anteil an negativ geladenem DOPG im DOPE/DOPC-Gemisch nahm die Affinität der C-Domäne zur Lipidoberfläche zu (1/3 DOPG:  $K_d= 5,89 \mu\text{M}$ ; 2/3 DOPG:  $K_d= 3,32 \mu\text{M}$ ). Dies zeigt, dass elektrostatische Interaktionen zwischen der C-Domäne und den Lipiden entscheidend in den Interaktionsmechanismus involviert sind. Die Beobachtung, dass die C-Domäne aber auch mit der ladungsneutralen DOPE/DOPC-Oberfläche belegt, könnte implizieren, dass neben elektrostatischen auch andere Kräfte (zum Beispiel polare Wechselwirkungen) eine Rolle spielen. Da aber keine Referenzoberfläche gefunden wurde, mit der die C-Domäne nicht interagiert, kann nicht eindeutig ausgeschlossen werden, dass die Interaktion mit der DOPE/DOPC-Oberfläche unspezifisch war. Es wäre interessant zu testen, ob BetP in reinen DOPE/DOPC Liposomen aktiv beziehungsweise reguliert ist oder ob eine elektrostatische Interaktion mit den Lipidkopfgruppen obligatorisch für die BetP-Regulation ist. So wurde für den OpuA Transporter gezeigt, dass dieser in reinen DOPE/DOPC Liposomen nicht aktiviert werden kann (van der Heide *et al.*, 2001).

Überraschenderweise fiel die Affinität der C-Domäne zur Oberfläche aus *E. coli* Lipiden mit einem  $K_d$ -Wert von 11,9  $\mu\text{M}$  geringer aus als jene zur ladungsneutralen DOPE/DOPC-Oberfläche, obwohl hier etwa 20% der Kopfgruppen negativ geladen sein sollten (Herstellerangaben, Avanti, USA). Möglicherweise wird das Interaktionsverhalten der *E. coli* Lipide Proteinverunreinigungen in dem natürlichen Lipidextrakt so verändert, dass ein direkter Vergleich mit Lipidoberflächen aus synthetischen Peptiden nicht sinnvoll ist. Das Experiment mit der *E. coli* Oberfläche hat aber insofern eine Aussagekraft, als dass es belegt, dass die C-Domäne prinzipiell mit *E. coli* Membranlipiden interagieren kann.

Zusammenfassend untermauern die SPR-Daten die Idee, dass eine direkte Interaktion zwischen der C-Domäne und den Membranlipiden bei der BetP-Regulation eine Rolle spielt. Der Einfluss der Membranumgebung auf die Regulation C-terminaler Mutanten könnte somit direkt durch C-Domäne-Lipid-Kontakte ausgelöst werden. Die Beobachtung, dass die Affinität der C-Domäne zu den Oberflächen mit steigendem PG-Anteil der Lipide zunimmt und dass zugleich in einer PG-reichen Membranumgebung mehr Kalium zur BetP-Aktivierung benötigt wird als in einer PG-armen Membran (Schiller *et al.*, 2006), spricht für eine direkte Detektion von Kalium über die C-Domäne. Hierzu passt ein bereits früher vorgeschlagenes Modell für den BetP-Regulationsmechanismus, wonach die Interaktion der C-Domäne mit Lipiden bei der BetP-Aktivierung durch Kalium gelöst wird (Burger, 2002; Schiller, 2004). Die Ablösung der C-Extension von den Lipidoberflächen

durch erhöhte  $K^+$ -Konzentrationen konnte in dem isolierten SPR-System allerdings nicht nachgewiesen werden. Hierzu könnten aber zukünftig Experimente mit dem rekonstituierten Gesamtprotein und photoaktivierbaren Lipid-*cross-linkern* unter verschiedenen Kaliumbedingungen neue Informationen liefern (Gubbens *et al.*, 2007).

Ein elektrostatischer Schaltmechanismus wird auch für verschiedene andere Membranproteine berichtet. So wird für den Osmosensors OpuA vorgeschlagen, dass die elektrostatische Interaktion zwischen der C-terminalen CBS-Domäne und negativ geladenen Membranlipiden bei der Aktivierung durch eine erhöhte interne Ionenstärke aufgehoben werden. In diesem Fall wurde die C-Domäne-Lipidinteraktionen durch Co-Zentrifugation der isolierten Domäne mit Liposomen abgeschätzt (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006b). Ebenso wird für die Sensorhistidinkinase KdpD aus *E. coli* spekuliert, dass die elektrostatische Interaktion eines argininreichen Motivs in der cytoplasmatischen C-terminalen Domäne mit negativ geladenen Phospholipidkopfgruppen direkt in den Regulationsmechanismus involviert ist (Jung und Altendorf, 1998; Stallkamp *et al.*, 1999; Zimmann *et al.*, 2007). Spitzer und Poolman (2005) leiten unter anderem aus der Beobachtung, dass elektrostatische Kräfte osmosensorische Schaltmechanismen vermitteln, sogar ein generelles Modell für eine funktionale elektrochemische Struktur des Cytoplasmas ab.

### **Die C-Domäne interagiert mit bestimmten cytoplasmatischen Proteinbereichen**

Sowohl die Daten aus C-terminalen Mutagenesestudien als auch SPR-Daten zur Interaktion der C-Domäne mit Lipidoberflächen lassen ein Modell zu, nachdem die C-Domäne zusammen mit den Lipiden direkt als Kaliumsensor fungiert. Trotzdem konnte bisher keine spezifische Kaliumbindestelle in der Domäne definiert werden. Von daher ist es auch denkbar, dass eine Kaliumbindestelle zusammen mit anderen Proteinbereichen ausgebildet wird. Interaktionen der C-Domäne mit anderen Proteinbereichen könnten aber nicht nur in die Detektion, sondern auch in die Transduktion des Kaliumsignals eingebunden sein. Die Rolle der cytoplasmatischen Proteinschleifen war bislang nur punktuell durch einige Aminosäuresubstitutionen in den Schleifen untersucht worden. Hierbei war aber kein Hinweis auf eine Funktion dieser Proteinbereiche in der BetP-Regulation gefunden worden (Ott, 2005). In dieser Arbeit wurden *peptide arrays* verwendet um nach mit der C-Domäne interagierenden BetP-Regionen zu suchen. Diese *in vitro* Methode wird häufig verwendet um Epitope für Antikörper zu identifizieren (Reineke *et al.*, 1999). Jedoch konnten auch komplexe Protein-Protein Interaktionen damit analysiert werden wie zum Beispiel die Substratbindestelle eines *signal recognition particle* aus *Arabidopsis thaliana* (Groves *et al.*, 2001).

Mittels *peptide array* Experimenten konnte hier gezeigt werden, dass die an GST-fusionierte C-Domäne mit synthetischen Peptiden interagiert, die ausgedehnten Bereichen verschiedener cytoplasmatischer Proteinbereiche entsprechen. Diese waren die Schleifen 2, 4 und 8 sowie der membranständige Bereich der N-terminalen BetP-Extension und der C-Extension selbst. Die Beobachtung, dass die Interaktionen der C-Domäne mit den Peptiden nicht durch hohe Kaliumkonzentrationen beeinflusst werden konnte, könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese eher in den Mechanismus der Signaltransduktion als in die direkte Kaliumdetektion involviert sind.

Interessanterweise belegen vorläufige röntgenkristallographische Daten für das BetP-Trimer, dass im Kristall die C-terminale Domäne eines BetP-Monomers in direkter Nachbarschaft zu den Schleifen 2, 4, und 8 des benachbarten Monomers positioniert ist. Zudem können im Kristall auch C-Domäne-C-Domäne Kontakte beobachtet werden. Eine Aussage über die Nachbarschaft zwischen C-Domäne und N-Domäne ist an Hand der aktuellen Daten noch nicht möglich (Susanne Ressler, persönliche Mitteilung). Auch wenn die Röntgenstrukturdaten nur eine fixierte BetP-Konformation wiedergeben, kann hiermit belegt werden, dass die im isolierten System der *peptide arrays* beobachteten Interaktionen auch *in vivo* möglich sind und somit eine Funktion im Mechanismus der BetP-Regulation haben können. Besonders interessant erscheint hier die Interaktion der C-Domäne mit Schleife 8, da dieser Proteinbereich in der Familie der BCC-Transporter hochkonserviert und vermutlich in den Substrattransport involviert ist (Peter *et al.*, 1996; Kappes *et al.*, 1996). Es kann spekuliert werden, dass eine solche Interaktion für die Transduktion des aktivierenden Signals benötigt wird. Für den Ammonium-Transporter Amt 1;1 aus *Arabidopsis thaliana* wurde gezeigt, dass hier eine allosterische *trans*-Aktivierung zwischen den Monomeren des Homotrimers über die cytoplasmatische C-terminale Domäne vermittelt wird (Loqué *et al.*, 2007). Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für BetP denkbar.

Die Hinweise auf einen Regulationsmechanismus, in dem die mittels *peptide arrays* identifizierten C-Domäne-Interaktionspartner von Bedeutung sein könnten, sollten durch eine unabhängige Methode überprüft werden. Dazu wurden Konkurrenzexperimente in Proteoliposomen durchgeführt. Auf Grund der Übereinstimmung mit existierenden *resonant mirror* Daten wurden für diese Experimente Schleife 4 und 8 (Burger, 2002) und darüber hinaus die N-Domäne ausgewählt. Es wurde überprüft, inwiefern ein zehnfach molarer Überschuss an Peptiden gegenüber dem BetP-Protein im Lumen der Proteoliposomen die Aktivitätsregulation von BetP beeinflussen kann. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein Überschuss an Peptid, welches der Schleife 8 oder dem membranständigen Teil der N-Domäne entspricht, die Osmoregulation von BetP erheblich

beeinträchtigt. Das BetP-Regulationsprofil beschrieb hier keine sigmoidale Optimumkurve mehr, sondern die BetP-Aktivität blieb im Bereich externer Osmolalitäten von 0,4-1,0 osmol/kg konstant. Im Gegensatz hierzu hatte die Gegenwart des Schleife-4-Peptides keinen Einfluss auf die BetP-Regulation. Die Signifikanz der beobachteten Effekte konnte durch Negativkontrollen belegt werden. So hatten Peptide mit der Sequenz von Schleife 10 und der *random*-Sequenz von Schleife 8 keinen Einfluss auf die BetP-Regulation. Die Ergebnisse der Konkurrenzexperimente können so interpretiert werden, dass die zugegebenen Peptide mit der C-Domäne des BetP-Proteins interagieren und so mit der normalerweise innerhalb des Proteins stattfindenden Interaktion, also zwischen C-Domäne und Schleife 8 oder N-Domäne, konkurrieren, wodurch der Regulationsmechanismus gestört wird. Zwar können diese *in vitro* Daten nur indirekt Belege für solche Interaktionen liefern, dennoch sind es erste Belege für eine Beteiligung weiterer cytoplasmatischer Proteinbereiche in den Mechanismus der BetP-Regulation.

### **Die Regulation N-terminal deletierter BetP-Varianten hängt von der Membrenumgebung ab**

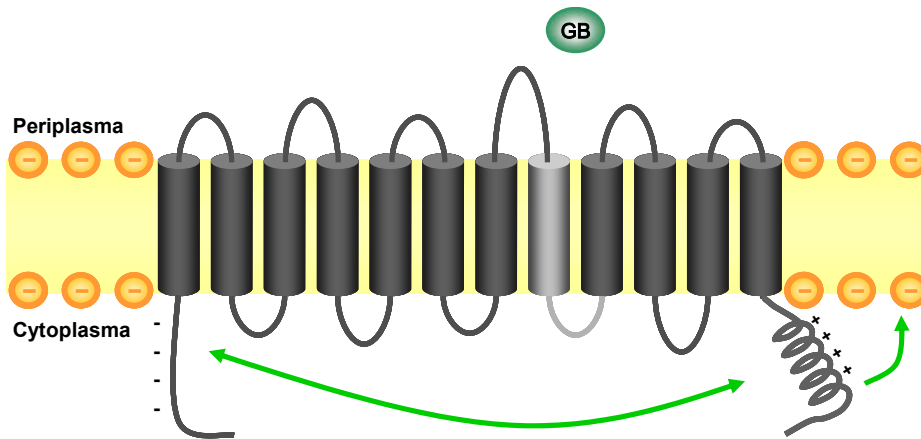
Zu Beginn dieser Arbeit gab es keine Hinweise auf eine direkte Funktion der N-terminalen Domäne in der BetP-Regulation. Diese cytoplasmatisch gelegene, 59 Aminosäurereste lange und überwiegend negativ geladene Domäne wurde als Modulator der BetP-Aktivität bezeichnet, da durch eine Deletion der Domäne die Aktivierungsschwelle für den Transporter stark erhöht wurde (Peter *et al.*, 1998a). Die Daten der *peptide arrays* sowie die Konkurrenzexperimente lieferten jedoch erste Hinweise auf eine mögliche Funktion dieser Domäne für die BetP-Regulation. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion der N-Domäne weiter analysiert, indem N-terminal verkürzte BetP-Varianten in verschiedenen Membrenumgebungen auf ihre osmoregulatorischen Eigenschaften untersucht wurden. Interessanterweise ergaben diese Messungen, dass das Regulationsverhalten der BetP-Varianten von der Membrenumgebung abhängt. BetP-Varianten mit N-terminalen Verkürzungen um 29 oder 53 Aminosäuren waren in *C. glutamicum* Zellen, also in einer Membrenumgebung mit negativ geladenen Kopfgruppen, osmotisch reguliert, wobei die Aktivierungsschwelle im Vergleich zur Kontrolle zu deutlich höheren externen Osmolalitäten verschoben war. Diese Beobachtung stimmte somit mit existierenden Daten für andere BetP-Varianten mit N-terminalen Verkürzungen überein (Peter *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu waren die N-terminalen BetP-Varianten erstaunlicherweise in *E. coli* Zellen, also in einer ladungsarmen Membrenumgebung, nicht osmotisch reguliert. Eine solche membranabhängige Regulation war bislang nur für BetP-Varianten mit C-terminalen Aminosäureaustauschen beobachtet worden. Auf Grund der SPR-

spektroskopischen Daten war in diesem Fall spekuliert worden, dass die Membraneffekte durch direkte Interaktionen der C-Domäne mit Lipiden zu Stande kommen. Diese Möglichkeit konnte für die N-Domäne ausgeschlossen werden, denn ein Peptid, welches den N-terminalen Aminosäureresten 28-64 entsprach, interagiert in den SPR-Messungen nicht mit Lipidoberflächen. Zudem fällt es schwer zu erklären, wie ein Effekt über eine direkte Interaktion der N-Domäne mit der Membran vermittelt werden soll, wenn dieser Effekt auch bei einer kompletten Deletion der N-Domäne auftritt. Wie kann also der Einfluss der Membranumgebung auf die N-terminalen BetP-Varianten zu Stande kommen? Die *peptide array* Daten hatten impliziert, dass C- und N-Domäne miteinander interagieren. Einen weiteren Hinweis in diese Richtung lieferte ein SPR-Experiment. Hier konnte beobachtet werden, dass die Gegenwart des N-Peptides die Interaktion der C-Domäne mit Membranlipiden reduzierte. Auf Grund der vorhandenen Informationen wäre ein Modell für den BetP-Regulationsmechanismus denkbar, indem C- und N-Domäne eine funktionale Interaktion miteinander eingehen und der Einfluss der Membran auf N-terminal deletierte BetP-Varianten indirekt über die C-Domäne vermittelt wird.

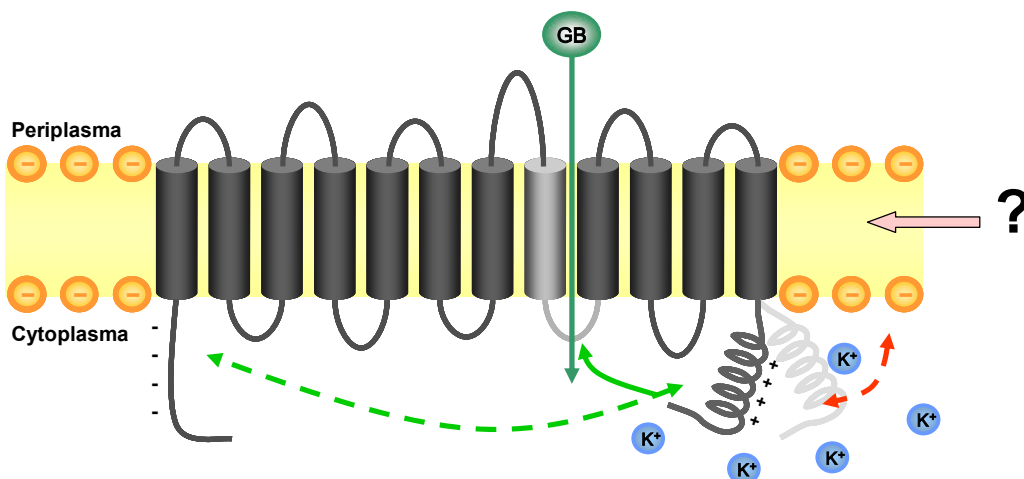
### **Ein neues Modell für den Regulationsmechanismus des Osmosensors BetP**

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zum Regulationsmechanismus des Osmosensors BetP lassen sich in einem aktualisierten Modell zusammenfassen (Abbildung 4.2). Ohne Stimulierung wird die  $\alpha$ -helikale C-terminale Domäne benötigt um BetP in seiner inaktiven Konformation (Abbildung 4.2A) zu fixieren. Die Position der C-Domäne wird hierbei über elektrostatische Interaktionen der C-Domäne mit Membranlipiden sowie mit der N-terminalen BetP-Domäne definiert. Bei einem hyperosmotischen Schock wird BetP durch zwei Stimuli aktiviert. Ein noch im Detail unbekannter Stimulus wird möglicherweise direkt über Wechselwirkungen mit der Membran auf den Transporter übertragen. Dies könnte der gleiche Stimulus sein, der auch zur kaliumunabhängigen Kältestimulierung von BetP führt (Özcan *et al.*, 2006). Der Zweite Stimulus ist die erhöhte interne Kaliumkonzentration. Für die Detektion des Kaliumstimulus gibt es drei Möglichkeiten. 1) Die Kaliumbindestelle wird von C-Domäne zusammen mit anderen Proteinbereichen definiert. 2) Kalium wird unabhängig von der C-Domäne detektiert und die Information über die C-Domäne weitergeleitet. In beiden Fällen kommen Interaktionen der C-Domäne mit den cytoplasmatischen Loops 2, 4, oder 8 in Frage. 3) Am wahrscheinlichsten ist es, dass Kalium direkt über die C-Domäne detektiert wird. Hierbei werden die Interaktionen der C-Domäne mit der N-Domäne moduliert und die mit den Lipiden aufgehoben (Abbildung 4.2B). Kalium induziert letztlich eine Konformationsänderung der C-Domäne.

**A Inaktives BetP-Protein**



**B Osmotisch stimuliertes BetP-Protein**



**Abbildung 4.2: Modell für den Regulationsmechanismus des Osmosensors BetP.** (A) **Inaktives BetP-Protein.** Grüne Pfeile: Die Position der C-Domäne wird über Interaktionen mit der N-Domäne sowie mit Membranlipiden definiert. (B) **Osmotisch stimuliertes BetP-Protein.** Ein bislang unbekannter Reiz sowie die erhöhte  $K^+$ -Konzentration lösen die BetP-Aktivierung aus. Der Kaliumstimulus wird direkt oder indirekt über die C-Domäne detektiert und induziert eine Konformationsänderung der Domäne, wodurch der gesamte Transporter in seine aktive Konformation übergeht. Hierbei werden die Interaktionen der C-Domäne moduliert und die Interaktion mit den Lipiden wird gelöst (gestrichelte Pfeile). Das aktivierende Signal wird möglicherweise über eine Interaktion der C-Domäne mit dem konservierten *loop 8* an das katalytische Zentrum des Transporters weitergeleitet.

Diese ist erforderlich um den gesamten Transporter in seine aktive Konformation zu versetzen. Das aktivierende Signal könnte hierbei über eine Interaktion der C-Domäne mit *loop 8* an die katalytische Einheit des Transporters weitergeleitet werden. Die Idee eines C-Domäne vermittelten Schaltmechanismus wird durch EPR-(*electron-paramagnetic-resonance*)-Messungen unterstützt, bei denen eine kaliuminduzierte Mobilität der C-Domäne beobachtet werden konnte. (Sascha Nicklisch, persönliche Mitteilung). Auf

Grund vorläufiger Strukturdaten ist es wahrscheinlich, dass die Interaktionen der C-Domäne mit anderen Proteinbereichen zwischen verschiedenen Monomeren stattfinden. Die Interaktion mit Lipiden könnte über eine laterale Flexibilität der C-Domäne vermittelt werden.

Das Umschalten der C-Domäne vom „Aus“- in den „Ein“-Zustand ist schwerer, wenn mehr negativ geladene Membranlipide vorhanden sind (Situation in *C. glutamicum* Zellen). Dann ist die zur Aktivierung erforderliche Kaliumkonzentration höher. Gleiches tritt auf wenn die N-Domäne fehlt (Situation in  $\Delta N$ -Mutanten). Es ist denkbar, dass die N-Domäne mit den Lipiden um die Interaktion mit der C-Domäne konkurriert und den Konformationswechsel erleichtert, indem sie die Interaktion der C-Domäne mit den Membranlipiden abschwächt. Zum Verlust der Osmoregulation kommt es, wenn der Anteil an negativ geladenen Membranlipiden gering ist und zugleich die N-Domäne deletiert ist. Dann führt eine fehlerhafte Orientierung der C-Domäne dazu, dass der Kaliumstimulus nicht mehr detektiert respektive weitergeleitet werden kann. Der Transporter ist dann in einem Zustand geringer Aktivität fixiert. Die gleiche Situation tritt bei Aminosäuresubstitutionen im zentralen Bereich der C-terminalen Domäne ein. Durch eine festere Interaktion der C-Domäne mit PG-reichen Membranen wird die korrekte Konformation der C-Domäne stabilisiert. Daher kann die Regulation in *C. glutamicum* Zellen aber schwerer durch Substitutionen gestört werden als in *E. coli* Zellen.

### **Ausblick**

Die in Kürze erwartete Lösung der Röntgenkristallstruktur des BetP-Proteins eröffnet vollkommen neue Perspektiven für die weitere Aufklärung des Regulationsmechanismus. So können detaillierte Informationen über die BetP-internen Kontakte der C-terminalen Domäne zusammen mit denen hier gewonnen Interaktionsdaten die Grundlage für gezielte Mutagenesestudien oder *cross-linking* Experimente bilden. Der Focus künftiger Projekte sollte aber auf biophysikalischen Methoden liegen, welche es erlauben, die im Modell postulierte Dynamik der C-Domäne bei der Aktivierung direkt zu untersuchen. Hierzu sollte das laufende EPR-(*electron-paramagnetic-resonance*)-Projekt fortgeführt werden (Nicklisch, 2005). Außerdem könnten fluoreszenzspektroskopische Methoden (*fluorescence-resonance-energy-transfer*) zur Anwendung kommen.

Ein zentrales und ausgesprochen spannendes Thema wird künftig auch die weitere Verfolgung der *in vivo* Untersuchungen zur Kaliumabhängigkeit der BetP-Stimulierung sein. Die hier vorgelegten Daten müssen zunächst durch eine zuverlässige Bestimmung des cytoplasmatischen Volumens verifiziert werden. In diesem Zusammenhang wäre es auch sehr interessant, BetP-Varianten, die in Proteoliposomen  $K^+$ -unabhängig konstitutiv



aktiv waren (zum Beispiel BetP $\Delta$ C25) in K<sup>+</sup>-verarmten Zellen zu charakterisieren (Schiller *et al.*, 2004b). Sollte sich bestätigen, dass es neben K<sup>+</sup>-einen weiteren Stimulus zur osmotischen BetP-Aktivierung gibt, so wird dessen Identifizierung und Charakterisierung die größte Herausforderung sein. Hierzu sollte vor allem der kürzlich beobachtete Einfluss des Fettsäuremusters auf die BetP-Osmoregulation näher untersucht werden (Henrich, 2008).

### **Osmosensoren im Vergleich: Verschiedene Mechanismen für dieselbe Funktion?**

Alle Osmosensoren, die in eine hyperosmotische Stressantwort eingebunden sind, müssen *in vivo* unter denselben physiologischen Bedingungen aktiviert werden, nämlich dann, wenn die Zelle Wasser verliert. Aus der *in vitro* Charakterisierung verschiedener Osmosensoren muss jedoch geschlossen werden, dass diese unterschiedliche Stimuli unter hyperosmotischen Stressbedingungen detektieren. Dennoch zeigt ein direkter Vergleich der drei am besten untersuchten Osmosensoren BetP aus *C. glutamicum*, ProP aus *E. coli* und OpuA aus *L. lactis* interessante Gemeinsamkeiten in den Aktivierungsmechanismen auf. Ebenso wie BetP werden sowohl der H<sup>+</sup>-Symporter ProP als auch der ABC-Transporter OpuA über ein cytoplasmatisches Signal stimuliert. Für ProP wurde beobachtet dass dieser sowohl durch verschiedene Ionen als auch durch nichtionische Solute und insbesondere durch langkettige Polyethylenglycole aktiviert wird (Culham *et al.*, 2003). Hier wurde postuliert, dass der Transporter über seinen Hydratationszustand reguliert wird. Die von Wood (2006) vertretene These, dass durch die verminderte Hydratation unter hyperosmotischen Bedingungen der Transportweg für die H<sup>+</sup>-Ionen geöffnet wird, ist aber bislang nur Spekulation (Wood, 2006). OpuA wird wie BetP auch durch eine erhöhte interne Ionenkonzentration aktiviert. Die Stimulierung ist hier jedoch im Gegensatz zu BetP nicht auf K<sup>+</sup>-Ionen beschränkt (Schiller *et al.*, 2004a), sondern kann prinzipiell von verschiedenen Ionen wie K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> ausgelöst werden. OpuA ist also ein Sensor für die generelle interne Ionenstärke, was auch durch die Beobachtung gestützt wird, dass zweiwertige Kationen effektiver wirken als einwertige Kationen. Kürzlich wurde jedoch interessanterweise beobachtet, dass K<sup>+</sup> als physiologisch relevantes Kation OpuA stärker stimuliert als andere einwertige Kationen (van der Heide *et al.*, 2001, Mahmood *et al.*, 2006). Obwohl die drei Transporter strukturell nicht miteinander verwandt sind, ist interessanterweise in allen drei Fällen ihre cytoplasmatische C-terminale Domäne in den Regulationsmechanismus involviert. Sowohl für BetP als auch für OpuA, wird für die jeweilige C-terminale Domäne eine direkte Sensorfunktion als möglich erachtet, die aber in beiden Fällen nicht eindeutig nachgewiesen ist (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006b; Schiller *et al.*, 2004b, diese Arbeit).

Lediglich im Falle von BetP konnten neben der C-Domäne auch andere Proteinbereiche identifiziert werden, die möglicherweise in die Regulation involviert sind (diese Arbeit). Da ProP über seinen Hydratationszustand reguliert wird, muss im Protein keine spezifische Sensordomäne existieren. Die C-terminale Domäne von ProP moduliert aber die Regulation des Transporters, indem sie durch Dimerisierung über ein *coiled-coil* Motiv die Aktivierungsschwelle für ProP herabsetzt. Eine Verkürzung der Domäne führt zum totalen Verlust der ProP-Aktivität (Culham *et al.*, 2000; Hillar *et al.*, 2005). Eine weitere Gemeinsamkeit der Aktivierungsmechanismen von ProP, BetP und OpuA liegt in der Lipidabhängigkeit ihrer Aktivierungsschwellen. Für alle drei Osmosensoren wird diese mit steigendem Anteil an negativ geladenen Lipiden erhöht und in allen drei Fällen wird angenommen, dass dieser Lipideffekt direkt über die C-terminale Domäne vermittelt wird (Schiller *et al.*; 2006, Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006b; Romantsov *et al.*, 2008).

Trotz Unterschiede in den Details weisen die Aktivierungsmechanismen von ProP, BetP und OpuA also eine Reihe von Gemeinsamkeiten auf. Hierdurch ist die Frage aufgekommen, ob die noch bislang noch lückenhaften Erkenntnisse nicht letztlich für alle Osmosensoren auf den gleichen Mechanismus hinauslaufen (Wood, 2006). Wie in dieser Arbeit am Beispiel von BetP gezeigt wurde, könnte künftig eine verstärkte *in vivo* Charakterisierung von Osmosensoren noch einmal ganz neue Aspekte in diese Diskussion einbringen.

## 5 Zusammenfassung

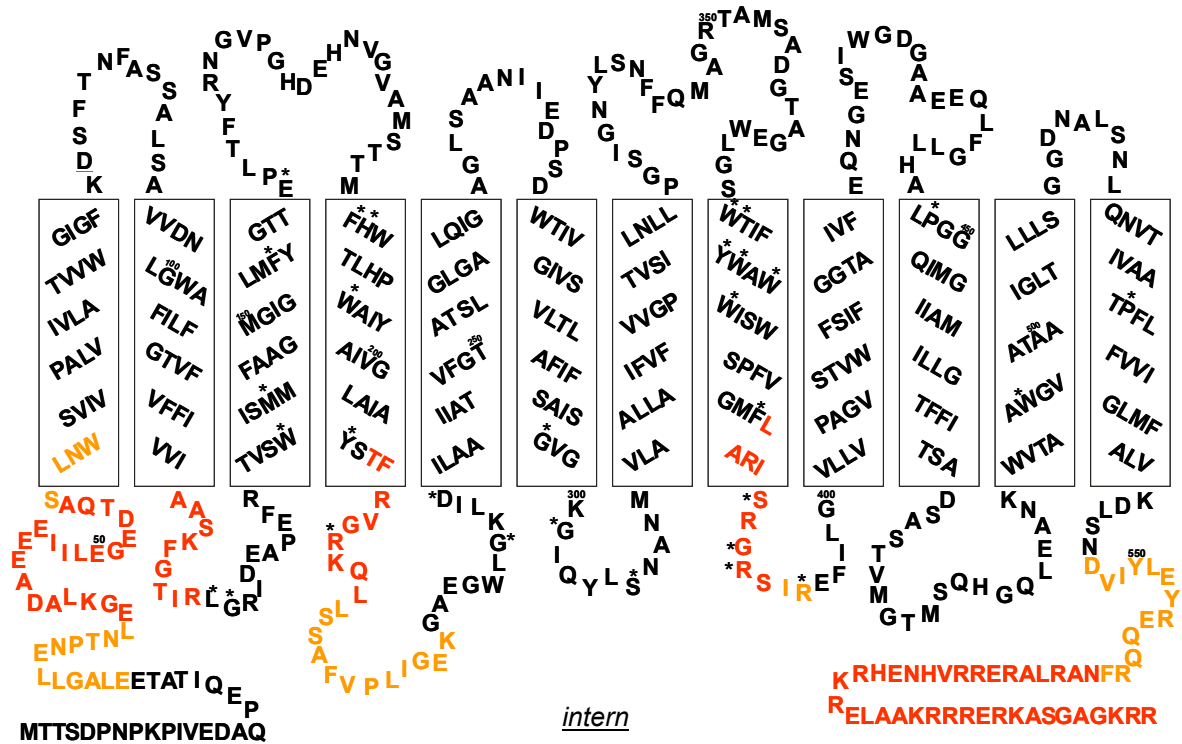
Der sekundäre Transporter BetP aus *C. glutamicum* vermittelt unter hyperosmotischen Bedingungen die Aufnahme des kompatiblen Solutes Glycinbetain im Symport mit zwei Natriumionen (Farwick, *et al.* 1995). Neben seiner katalytischen Funktion besitzt BetP auch sensorische und regulatorische Fähigkeiten (Rübenhagen *et al.*, 2000). Mit Hilfe von Proteoliposomen war gezeigt worden, dass der Transporter eine erhöhte interne  $K^+$ -Konzentration als Maß für osmotischen Stress über cytoplasmatisch gelegene Proteinbereiche detektiert und so seine Aktivität steuert (Rübenhagen *et al.*, 2001; Schiller *et al.*, 2004a). Zur Untersuchung, ob die Aktivierung von BetP auch in lebenden Zellen von Kalium abhängt, wurde hier die BetP-Aktivität in kaliumverarmten Zellen mit der BetP-Aktivität in kaliumsupplementierten Zellen verglichen. In  $K^+$ -vorbelaenen Zellen war der Transporter unmittelbar nach der Applikation eines hyperosmotischen Schocks voll aktiv. Dagegen hing die BetP-Aktivierung in  $K^+$ -verarmten Zellen von der Möglichkeit zur Aufnahme von  $K^+$  aus dem Medium ab. Radiochemische Transportmessungen mit  $^{86}Rb^+$  konnte belegen, dass der Verlauf der BetP-Aktivierung hier zeitlich direkt mit dem Anstieg der intrazellulären  $K^+$ -Konzentration korrelierte. Die *in vitro* beobachtete  $K^+$ -Abhängigkeit der BetP-Stimulierung konnte also *in vivo* verifiziert werden. Jedoch wurde beobachtet, dass hohe interne  $K^+$ -Konzentrationen nur dann zur BetP-Stimulierung führten, wenn zugleich ein hyperosmotischer Schock appliziert wurde. Hieraus muss gefolgert werden, dass  $K^+$  notwendig aber nicht hinreichend für die Aktivierung von BetP *in vivo* ist und dass es in ganzen Zellen neben Kalium noch einen zweiten unbekanntem Stimulus geben muss, der benötigt wird, um BetP osmotisch zu stimulieren.

Im Vorfeld dieser Arbeit war gezeigt worden, dass die cytoplasmatische C-terminale Extension von BetP in den Mechanismus der  $K^+$ -abhängigen BetP-Aktivierung involviert ist. Durch ortsgerichtete Mutagenese innerhalb dieser Domäne konnte hier gezeigt werden, dass die Regulation von BetP von der ungestörten  $\alpha$ -helikalen Struktur an sich und von der nativen Aminosäuresequenz in einem zentralen Bereich der Domäne abhängt. Die osmoregulatorische Charakterisierung C-terminaler Prolinmutanten in verschiedenen Membranumgebungen wies darauf hin, dass ein hoher Gehalt an negativ geladenen Membranlipiden die korrekte, für einen funktionierenden Regulationsmechanismus benötigte Konformation der Domäne stabilisiert. Eine direkte Interaktion der C-Domäne mit unterschiedlichen Lipiden konnte durch Oberflächenplasmonresonanz-Messungen belegt werden. Die These, dass eine Interaktion zwischen der C-Domäne und den Membranlipiden unmittelbar in den

Regulationsmechanismus von BetP involviert ist, konnte durch diese biochemischen und biophysikalischen Daten somit belegt werden. Außerdem wurden durch biochemische Methoden cytoplasmatische Schleifen sowie die N-terminale BetP-Domäne als mit der C-Domäne interagierende Bereiche identifiziert, welche sehr wahrscheinlich zusammen mit der C-Extension in den Mechanismus der Kaliumdetektion oder in die Transduktion des aktivierenden Kaliumsignals involviert sind. Eine Funktion der N-terminalen BetP-Domäne im Aktivierungsmechanismus von BetP konnte durch die Charakterisierung N-terminal verkürzter Varianten weiter untermauert werden. Aus denen im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Daten konnte ein neues Modell für den Regulationsmechanismus des Osmosensors BetP entwickelt werden.

## 6 Anhang

### 6.1 Topologiemodell für BetP



**Abbildung 6.1: Topologievorhersage für BetP mit Übersicht der *peptide array* Ergebnisse.** Die innerhalb der BCCT-Familie konservierten Aminosäurereste sind mit \* gekennzeichnet. Farbige Buchstaben: Sequenzen der im *peptide array* mit der C-Domäne interagierenden Bereiche. Rot: Kernbereiche (in allen Wiederholungen positiv); orange: Randbereiche (nicht in allen Wiederholungen positiv). Vorhersageprogramm: TMHMM 2.0 (modifiziert nach Sascha Nicklisch, unveröffentlicht und Rübenhagen, 2001).

## 6.2 Sequenzen zu *peptide arrays*

Im Folgenden sind die Aminosäuresequenzen der Oligopeptide der *peptide array-spots* angegeben. Die laufenden Nummern beziehen sich auf die *spots*, die in Reihen von links nach rechts auf der Membran verlaufen.

### Reihe 1

```

1 M T T S D P N P K P I V E D A
2 S D P N P K P I V E D A Q P E
3 N P K P I V E D A Q P E Q I T
4 P I V E D A Q P E Q I T A T E
5 E D A Q P E Q I T A T E E L A
6 Q P E Q I T A T E E L A G L L
7 Q I T A T E E L A G L L E N P
8 A T E E L A G L L E N P T N L
9 E L A G L L E N P T N L E G K
10 G L L E N P T N L E G K L A D
11 E N P T N L E G K L A D A E E
12 T N L E G K L A D A E E E I I
13 E G K L A D A E E E I I L E G
14 L A D A E E E I I L E G E D T
15 A E E E I I L E G E D T Q A S
16 E I I L E G E D T Q A S L N W
17 L E G E D T Q A S L N W S V I
18 E D T Q A S L N W S V I V P A
19 Q A S L N W S V I V P A L V I
20 L N W S V I V P A L V I V L A
21 S V I V P A L V I V L A T V V
22 V P A L V I V L A T V V W G I
23 L V I V L A T V V W G I G F K
24 V L A T V V W G I G F K D S F
25 T V V W G I G F K D S F T N F
26 W G I G F K D S F T N F A S S
27 G F K D S F T N F A S S A L S
28 D S F T N F A S S A L S A V V
29 T N F A S S A L S A V V D N L
30 A S S A L S A V V D N L G W A
31 A L S A V V D N L G W A F I L
32 A V V D N L G W A F I L F G T
33 D N L G W A F I L F G T V F V
34 G W A F I L F G T V F V F F I
35 F I L F G T V F V F F I V V I
36 F G T V F V F F I V V I A A S
37 V F V F F I V V I A A S K F G

```

### Reihe 2

```

38 F F I V V I A A S K F G T I R
39 V V I A A S K F G T I R L G R
40 A A S K F G T I R L G R I D E
41 K F G T I R L G R I D E A P E
42 T I R L G R I D E A P E F R T
43 L G R I D E A P E F R T V S W
44 I D E A P E F R T V S W I S M
45 A P E F R T V S W I S M M F A
46 F R T V S W I S M M F A A G M
47 V S W I S M M F A A G M G I G
48 I S M M F A A G M G I G L M F
49 M F A A G M G I G L M F Y G T

```

```

50 A G M G I G L M F Y G T T E P
51 G I G L M F Y G T T E P L T F
52 L M F Y G T T E P L T F Y R N
53 Y G T T E P L T F Y R N G V P
54 T E P L T F Y R N G V P G H D
55 L T F Y R N G V P G H D E H N
56 Y R N G V P G H D E H N V G V
57 G V P G H D E H N V G V A M S
58 G H D E H N V G V A M S T T M
59 E H N V G V A M S T T M F H W
60 V G V A M S T T M F H W T L H
61 A M S T T M F H W T L H P W A
62 T T M F H W T L H P W A I Y A
63 F H W T L H P W A I Y A I V G
64 T L H P W A I Y A I V G L A I
65 P W A I Y A I V G L A I A Y S
66 I Y A I V G L A I A Y S T F R
67 I V G L A I A Y S T F R V G R
68 L A I A Y S T F R V G R K Q L
69 A Y S T F R V G R K Q L L S S
70 T F R V G R K Q L L S S A F V
71 V G R K Q L L S S A F V P L I
72 K Q L L S S A F V P L I G E K
73 L S S A F V P L I G E K G A E
74 A F V P L I G E K G A E G W L

```

### Reihe 3

```

75 P L I G E K G A E G W L G K L
76 G E K G A E G W L G K L I D I
77 G A E G W L G K L I D I L A I
78 G W L G K L I D I L A I I A T
79 G K L I D I L A I I A T V F G
80 I D I L A I I A T V F G T A C
81 L A I I A T V F G T A C S L G
82 I A T V F G T A C S L G L G A
83 V F G T A C S L G L G A L Q I
84 T A C S L G L G A L Q I G A G
85 S L G L G A L Q I G A G L S A
86 L G A L Q I G A G L S A A N I
87 L Q I G A G L S A A N I I E D
88 G A G L S A A N I I E D P S D
89 L S A A N I I E D P S D W T I
90 A N I I E D P S D W T I V G I
91 I E D P S D W T I V G I V S V
92 P S D W T I V G I V S V L T L
93 W T I V G I V S V L T L A F I
94 V G I V S V L T L A F I F S A
95 V S V L T L A F I F S A I S G
96 L T L A F I F S A I S G V G K
97 A F I F S A I S G V G K G I Q
98 F S A I S G V G K G I Q Y L S
99 I S G V G K G I Q Y L S N A N

```

100 V G K G I Q Y L S N A N M V L  
 101 G I Q Y L S N A N M V L A A L  
 102 Y L S N A N M V L A A L L A I  
 103 N A N M V L A A L L A I F V F  
 104 M V L A A L L A I F V F V V G  
 105 A A L L A I F V F V V G P T V  
 106 L A I F V F V V G P T V S I L  
 107 F V F V V G P T V S I L N L L  
 108 V V G P T V S I L N L L P G S  
 109 P T V S I L N L L P G S I G N  
 110 S I L N L L P G S I G N Y L S  
 111 N L L P G S I G N Y L S N F F

**Reihe 4**

112 P G S I G N Y L S N F F Q M A  
 113 I G N Y L S N F F Q M A G R T  
 114 Y L S N F F Q M A G R T A M S  
 115 N F F Q M A G R T A M S A D G  
 116 Q M A G R T A M S A D G T A G  
 117 G R T A M S A D G T A G E W L  
 118 A M S A D G T A G E W L G S W  
 119 A D G T A G E W L G S W T I F  
 120 T A G E W L G S W T I F Y W A  
 121 E W L G S W T I F Y W A W W I  
 122 G S W T I F Y W A W W I S W S  
 123 T I F Y W A W W I S W S P F V  
 124 Y W A W W I S W S P F V G M F  
 125 W W I S W S P F V G M F L A R  
 126 S W S P F V G M F L A R I S R  
 127 P F V G M F L A R I S R G R S  
 128 G M F L A R I S R G R S I R E  
 129 L A R I S R G R S I R E F I L  
 130 I S R G R S I R E F I L G V L  
 131 G R S I R E F I L G V L L V P  
 132 I R E F I L G V L L V P A G V  
 133 F I L G V L L V P A G V S T V  
 134 G V L L V P A G V S T V W F S  
 135 L V P A G V S T V W F S I F G  
 136 A G V S T V W F S I F G G T A  
 137 S T V W F S I F G G T A I V F  
 138 W F S I F G G T A I V F E Q N  
 139 I F G G T A I V F E Q N G E S  
 140 G T A I V F E Q N G E S I W G  
 141 I V F E Q N G E S I W G D G A  
 142 E Q N G E S I W G D G A A E E  
 143 G E S I W G D G A A E E Q L F  
 144 I W G D G A A E E Q L F G L L  
 145 D G A A E E Q L F G L L H A L  
 146 A E E Q L F G L L H A L P G G  
 147 Q L F G L L H A L P G G Q I M  
 148 G L L H A L P G G Q I M G I I

**Reihe 5**

149 H A L P G G Q I M G I I A M I  
 150 P G G Q I M G I I A M I L L G  
 151 Q I M G I I A M I L L G T F F  
 152 G I I A M I L L G T F F I T S  
 153 A M I L L G T F F I T S A D S  
 154 L L G T F F I T S A D S A S T  
 155 T F F I T S A D S A S T V M G  
 156 I T S A D S A S T V M G T M S  
 157 A D S A S T V M G T M S Q H G  
 158 A S T V M G T M S Q H G Q L E  
 159 V M G T M S Q H G Q L E A N K  
 160 T M S Q H G Q L E A N K W V T  
 161 Q H G Q L E A N K W V T A A W  
 162 Q L E A N K W V T A A W G V A  
 163 A N K W V T A A W G V A T A A  
 164 W V T A A W G V A T A A I G L  
 165 A A W G V A T A A I G L T L L  
 166 G V A T A A I G L T L L L S G  
 167 T A A I G L T L L L S G G D N  
 168 I G L T L L L S G G D N A L S  
 169 T L L L S G G D N A L S N L Q  
 170 L S G G D N A L S N L Q N V T  
 171 G D N A L S N L Q N V T I V A  
 172 A L S N L Q N V T I V A A T P  
 173 N L Q N V T I V A A T P F L F  
 174 N V T I V A A T P F L F V V I  
 175 I V A A T P F L F V V I G L M  
 176 A T P F L F V V I G L M F A L  
 177 F L F V V I G L M F A L V K D  
 178 V V I G L M F A L V K D L S N  
 179 G L M F A L V K D L S N D V I  
 180 F A L V K D L S N D V I Y L E  
 181 V K D L S N D V I Y L E Y R E  
 182 L S N D V I Y L E Y R E Q Q R  
 183 D V I Y L E Y R E Q Q R F N A  
 184 Y L E Y R E Q Q R F N A R L A  
 185 Y R E Q Q R F N A R L A R E R

**Reihe 6**

186 Q Q R F N A R L A R E R R V H  
 187 F N A R L A R E R R V H N E H  
 188 R L A R E R R V H N E H R K R  
 189 R E R R V H N E H R K R E L A  
 190 R V H N E H R K R E L A A K R  
 191 N E H R K R E L A A K R R R E  
 192 R K R E L A A K R R R E R K A  
 193 E L A A K R R R E R K A S G A  
 194 A K R R R E R K A S G A G K R  
 195 K R R R E R K A S G A G K R R

### 6.3 Sekundärstrukturvorhersagen für C-terminale BetP-Varianten

**A**

	550										560										570										580										590															
WT	L	V	K	D	L	S	N	D	V	I	Y	L	E	Y	R	E	Q	Q	R	F	N	A	R	L	A	R	E	R	R	V	H	N	E	H	R	K	R	E	L	A	A	K	R	R	R	E	R	K	A	S	G	A	G	K	R	R
WT	9	4	2	1	3	6	7	8	7	9	9	8	5	0	3	4	4	5	6	7	8	8	8	7	6	6	6	5	4	4	3	2	6	6	6	7	7	7	8	8	7	7	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9
Y550P	9	4	2	2	4	6	7	7	5	5	4	1	1	2	4	3	5	6	6	7	8	8	8	7	6	6	6	5	4	5	4	3	7	7	6	7	7	7	8	8	8	7	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9
E555P	9	4	1	0	3	6	7	8	8	9	9	9	7	0	5	3	4	5	6	7	8	8	7	6	6	6	5	4	5	4	3	7	7	6	7	7	7	8	8	8	7	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9	
R558P	9	4	2	0	3	6	7	8	7	9	9	8	7	2	0	0	3	6	2	3	5	7	7	6	6	6	6	5	4	5	4	3	7	7	6	7	7	7	8	8	8	7	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9
A564P	9	4	2	0	3	6	7	8	7	9	9	8	5	0	2	2	2	2	4	5	6	5	3	0	1	3	3	2	3	4	4	4	7	7	6	7	7	7	8	8	8	7	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9
R565P	9	4	2	0	3	6	7	8	7	9	9	8	5	1	2	2	3	4	4	5	6	6	3	0	3	1	1	1	2	3	2	2	7	7	6	7	7	7	8	8	8	7	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9
E566P	9	4	2	0	3	6	7	8	7	9	9	8	5	0	2	3	3	4	5	6	7	7	5	2	5	3	1	0	1	2	2	2	7	7	6	7	7	7	8	8	8	7	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9
R567P	9	4	2	0	3	6	7	8	7	9	9	8	5	0	3	3	3	4	5	6	7	8	7	4	1	3	6	3	1	0	0	1	7	7	6	7	7	7	8	8	8	7	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9
R568P	9	4	2	0	3	6	7	8	7	9	9	8	5	0	3	3	4	5	5	7	7	7	6	4	0	0	0	5	4	0	0	0	7	6	7	8	7	7	8	8	8	7	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9
V569P	9	4	2	0	3	6	7	8	7	9	9	8	5	0	3	3	4	5	6	7	7	8	7	5	2	2	1	3	5	3	2	1	6	6	6	8	7	7	8	8	8	7	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9
H570P	9	4	2	0	3	6	7	8	7	9	9	8	5	0	3	3	4	5	6	7	8	8	7	6	6	5	3	0	5	7	4	1	6	7	7	8	7	7	8	8	8	7	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9
H571P	9	4	2	0	3	6	7	8	7	9	9	8	5	0	3	3	4	5	6	7	8	8	7	6	5	5	3	0	3	4	7	1	7	8	6	7	7	7	8	8	8	7	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9
E572P	9	4	2	0	3	6	7	8	7	9	9	8	5	0	3	3	4	5	6	7	8	8	7	6	5	5	4	1	0	1	4	7	7	7	7	7	8	8	8	7	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9		
H573P	9	4	2	1	3	6	7	8	7	9	9	8	5	0	3	3	4	5	6	7	8	8	7	6	5	5	4	3	2	0	5	4	1	3	4	5	7	7	7	7	7	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9	
R574P	9	4	2	1	3	6	7	8	7	9	9	8	5	0	3	3	4	5	6	7	8	8	7	6	6	5	4	3	2	0	2	0	3	3	1	5	6	7	7	7	7	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9	
K575P	9	4	2	1	3	6	7	8	7	9	9	8	5	0	3	3	4	5	6	7	8	8	7	6	6	6	4	3	2	0	2	1	4	5	1	5	6	7	8	7	6	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9	
R576P	9	4	2	1	3	6	7	8	7	9	9	8	5	0	3	3	4	5	6	7	8	8	7	6	6	6	5	4	3	2	0	0	1	3	7	3	4	6	6	6	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9		
L578P	9	4	2	1	3	6	7	8	7	9	9	8	5	0	3	3	4	5	6	7	8	8	7	6	6	6	5	4	3	1	4	3	0	0	2	6	1	2	4	5	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9			
A580P	9	3	2	2	3	6	7	7	6	8	7	2	0	5	7	6	5	8	9	9	9	9	8	7	7	7	6	5	3	3	2	2	7	7	6	7	6	4	1	0	0	0	0	1	4	6	7	8	8	7	7	7	9			
R582P	9	3	2	2	3	6	7	8	6	8	7	2	0	5	7	6	5	8	9	9	9	9	8	7	7	7	6	5	3	3	2	2	7	7	6	6	6	5	2	1	2	4	2	0	0	0	1	2	6	7	7	8	8	7	9	
R584P	9	3	2	2	3	6	7	8	6	8	7	2	0	5	7	6	5	8	9	9	9	9	8	7	7	7	6	5	3	3	2	2	6	6	5	5	4	4	3	1	0	2	5	6	4	3	3	3	4	7	8	7	8	8	7	9

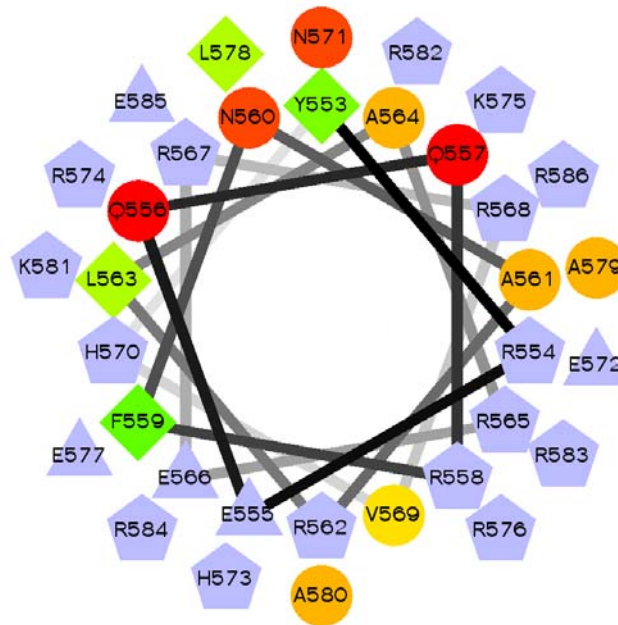
**B**

	550										560										570										580										590															
WT	L	V	K	D	L	S	N	D	V	I	Y	L	E	Y	R	E	Q	Q	R	F	N	A	R	L	A	R	E	R	R	V	H	N	E	H	R	K	R	E	L	A	A	K	R	R	R	E	R	K	A	S	G	A	G	K	R	R
WT	9	4	2	1	3	6	7	8	7	9	9	8	5	0	3	4	4	5	6	7	8	8	8	7	6	6	6	5	4	4	3	2	6	6	6	7	7	7	8	8	7	7	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9
Y550A	9	4	2	1	3	6	7	8	7	8	8	6	4	0	3	4	4	5	6	7	8	8	8	7	6	6	6	5	4	5	4	3	7	7	6	7	7	7	8	8	8	7	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9
E555A	9	4	2	0	3	6	7	8	7	8	8	6	4	1	5	4	3	5	6	7	8	8	8	7	6	6	6	5	4	5	4	3	7	7	6	7	7	7	8	8	8	7	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9
E555R	9	4	2	0	3	6	7	8	7	8	8	6	3	0	3	3	3	5	5	7	8	8	8	7	6	6	6	5	4	5	4	3	7	7	6	7	7	7	8	8	8	7	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9
R558A	9	4	2	0	3	6	7	8	7	9	9	7	4	1	4	5	5	6	7	8	8	8	7	6	6	6	5	4	5	4	3	7	7	6	7	7	7	8	8	8	7	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9	
R558D	9	4	2	0	3	6	7	8	7	9	9	7	5	0	2	3	3	4	5	7	8	8	8	7	6	6	6	5	4	5	4	3	7	7	6	7	7	7	8	8	8	7	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9
A564K	9	4	2	0	3	6	7	8	7	9	9	8	5	0	3	3	4	6	6	7	8	9	8	7	7	7	6	6	5	4	7	7	6	7	7	7	8	8	8	7	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9		
A564D	9	4	2	0	3	6	7	8	7	9	9	8	5	0	2	3	3	5	5	6	7	8	7	7	7	6	6	5	4	7	7	6	7	7	7	8	8	8	7	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9			
R568A	9	4	2	0	3	6	7	8	7	9	9	8	5	0	3	3	4	5	6	7	8	8	8	7	7	7	6	5	4	7	7	6	7	7	7	8	8	8	7	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9			
R568D	9	4	2	0	3	6	7	8	7	9	9	8	5	0	3	3	4	5	6	7	8	8	7	5	4	4	5	5	5	6	5	4	7	7	7	7	7	8	8	8	7	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9	
E572K	9	4	2	0	3	6	7	8	7	9	9	8	5	0	3	3	4	5	6	7	8	8	8	7	6	6	6	5	5	6	5	4	7	7	7	7	7	8	8	8	7	6	5	4	3	1	0	2	7	7	7	8	8	7	9	
R576A	9	4	2	1	3	6	7	8	7	9	9	8	5	0	3	3	4	5	6	7	8	8	8	7	6	6	6	5																												





## 6.4 Helical wheel Vorhersage für die C-terminale Domäne



**Abbildung 6.4: Helical wheel Vorhersage für die putative C-terminale  $\alpha$ -Helix** (nach 3DPSSM die Aminosäurereste 553-586 umfassend). ●: hydrophile Reste; ◆: hydrophobe Reste; Farbcode: von grün (hydrophob) über gelb und orange nach rot (hydrophil). ▲: potentiell negativ geladene Reste; ▼: potentiell positiv geladene Reste. ([www.rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi?sequence=ABCDEFGHIJKLMNPO&submit=Submit](http://www.rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi?sequence=ABCDEFGHIJKLMNPO&submit=Submit)).

## 7 Literatur

**Abe, S., Takayama, K. und Kinoshita, S. (1967)** Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 13, 279-301.

**Anderluh, G., Besenicar, M., Kladnik, A., Lakey, J. H., Macek, P. (2005)** Properties of nonfused liposomes immobilized on an L1 Biacore chip and their permeabilization by a eukaryotic pore-forming toxin, *Anal. Biochem.* 344, 43-52.

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

**Baldwin, W. W., Sheu, M. J., Bankston, P. W. und Woldringh, C. L. (1988)** Changes in buoyant density and cell size of *Escherichia coli* in response to osmotic shocks, *J. Bacteriol.* 170, 452-455.

**Barlow, D. J. und Thornton, J. M. (1988)** Helix geometry in Proteins, *J. Mol. Biol.* 201, 601-619.

**Bass, R. B., Strop, P., Barclay, M. und Rees, D. C. (2002)** Crystal structure of *Escherichia coli* MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel, *Science* 298, 1582-1587.

**Becker, M. (2007)** Untersuchungen zum Kaliumtransport in *Corynebacterium glutamicum*, Diplomarbeit, Universität zu Köln.

**Biacore AB (1994)** BIAApplications Handbook. *Biacore Uppsala Schweden.*

**Biacore (1997)** Kinetic and Affinity Analysis using BIA, Level1, *Biacore Upsala Schweden.*

**Biemans-Oldehinkel, E., Doeven, M. K. und Poolman, B. (2006a)** ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains, *FEBS Lett.* 580, 1023-1035.

**Biemans-Oldehinkel, E., Mahmood, N. A. und Poolman, B. (2006b)** A sensor for intracellular ionic strength. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 10624-10629.

**Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J. (1987)** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, *Elektrophoresis* 8, 93-99.

**Blumwald, E., Mehlhorn, R. J., und Packer, L. (1983)** Studies of osmoregulation in salt adaptation of cyanobacteria with ESR spin-probe techniques, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 2599-2602.

**Berrier, C., Coulombe, A., Houssin, C., und Ghazi, A. (1992)** Fast and slow kinetics of porin channels from *Escherichia coli* reconstituted into giant liposomes and studied by patch-clamp, *FEBS Lett.* 306, 251-256.

**Berrier, C., Besnar, B., Ajouz, B., Colombe, A. und Ghazi, A. (1996)** Multiple mechanosensitive ion channels from *Escherichia coli*, activated at different thresholds of applied pressure, *J. Membr. Biol.* 151, 175-187.

**Booth, R. B., Edwards, M. D., Black, S., Schumann, U. und Miller, S. (2007)** Mechanosensitive channels in bacteria: signs of closure?, *Nat. Rev. Microbiol* 5, 431-440.

**Botzenhardt, J., Morbach, S. und Krämer, R. (2004)** Activity regulation of the betaine transporter BetP of *Corynebacterium glutamicum* in response to osmotic compensation, *Biochim. Biophys. Acta* 1667, 229-240.

**Bradford, M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

**Bremer, E. und Krämer, R. (2000)** Coping with osmotic challenges: Osmoregulation through accumulation und release of compatible solutes in bacteria, in *Bacterial Stress Responses* (Storz, G. und Hengge-Aronis, R., Herausgeber) ASM Press, Washington, D.C., USA, 77-97.

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

**Calamita, G., Bishai, W. R., Preston, G. A., Guggino, W. B. und Agre, P. (1995)** Molecular cloning and characterization of AqpZ, water channel from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 270, 29063-29066.

**Chung, C. T., Niemela, S. L. und Mill, R. H. (1989)** One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2172-2175.

**Cooper, M. A., Hansson, A., Lofas, S. and Williams, D. H. (2000)** A vesicle capture sensor chip for kinetic analysis of interactions with membrane-bound receptors, *Anal. Biochem.* 277, 196-205.

**Cosgrove, D. J. (2000)** Der Wasserhaushalt der pflanzlichen Zellen, in *Physiologie der Pflanzen* (Taiz, L. und Zeiger, E., Herausgeber) Spektrum, Heidelberg, 60-100.

**Csonka, L. N. und Epstein, W. (1996)** Osmoregulation, in *Escherichia coli and Salmonella, cellular and molecular biology* (Neidhardt, F. C., Herausgeber), ASM PRESS, Washington D.C., 1210-1223.

**Culham, E. E., Lasby, B., Marangoni, A. G., Milner, L. J., Steer, A. B., van Nues, R. W. und 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, 268-276.

**Culham, D. E., Tripet, B. Racher, K. I., Voegelé, E. T., Hodges, R. S. und Wood, J. M. (2000)** The role of the carboxyterminal  $\alpha$ -helical coiled-coil domain in osmosensing by transporter ProP of *Escherichia coli*, *J. Mol. Recog.* 13, 309-322.

**Culham, D. E., Henderson, J., Crane, R. A. und 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, 410-420.

**Deber, C. M. und Therien, A. G. (2002)** Putting the  $\beta$ -breaks on membrane proteins, *Nature Struct. Biol.* 9, 318-319.

- Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmidt, R. und Bakker, E. P. (1988)** Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations, *Arch. Microbiol.* 150, 348-357.
- Erb, E. M., Chen, X., Allen, S., Roberts, C. J., Tendler, S. J., Davies, M. C. und Forsen, S. (2000)** Characterization of the surfaces generated by liposome binding to the modified dextran matrix of a surfaceplasmon resonance sensor chip, *Anal. Biochem.* 280, 29–35.
- Epstein, W. (1986)** Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 73-78.
- Epstein, W. (2003)** The roles and regulation of potassium in bacteria, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 75, 293-320.
- Farwick, M., Siewe, R. M., und Krämer, R. (1995)** Glycine betaine uptake after hyperosmotic shift in *Corynebacterium glutamicum*, *J. Bacteriol.* 177, 4690-4695.
- Galinski, E. A. und Trüper, H. G. (1994)** Microbial behavior in salt-stressed ecosystems, *FEMS Microbiol. Rev* 39, 73-78.
- Garner, M. M. und Burg, M. B. (1994)** Macromolecular crowding and confinement in cells exposed to hypertonicity. *Am. J. Physiol.* 266, 877-892.
- Grammann, K., Volke, A. und Kunte, H. J. (2002)** New Type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the *Bacteria* domain: TRAP transporter TeaABC mediates uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581T, *J. Bacterol.* 184, 3078–3085.
- Grant, S. G. N., Jessee, J., Bloom, F. R. und Hanahan, D. (1990)** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* K12, *J. Bacteriol.* 166, 6005-612.
- Groves, M. R., Mant, A., Kuhn, A., Koch, J., Dübel, S., Robinson, C. und Sinning, I. (2001)** Functional characterization of recombinant chloroplast signal recognition particle, *J. Biol. Chem.* 276, 27778-27786.
- Gubbens, J., Vader, P., Damen, J. M., O'Flaherty, M. C., Slijper, M., de Kruijff, B. und de Kroon, A. I. (2007)** Probing the membrane interface-interacting proteome using photoactivatable lipid cross-linkers, *J. Proteome. Res.* 61951-61962.
- Guillouet, S. und Engasser, J. M. (1995).** Sodium and proline accumulation in *Corynebacterium glutamicum* as a response to an osmotic saline upshock. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 315-320.
- Haardt, M., Kempf, B., Faatz, E. und Bremer, E. (1995)** The osmoprotectant proline betaine is a major substrate for the binding-protein-dependent transportsystem ProU of *Escherichia coli* K-12, *Mol. Gen. Genet.* 24686, 783-786.
- Hamann, K., Zimmann, P. und Altendorf, K. (2008)** Reduction of turgor is not the stimulus for the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 190, 2360-2367.

**Hanahan, D. (1985)** Techniques for transformation of *Escherichia coli*, in *DNA cloning*, (Glover, D. M., Herausgeber), IRL Press, Oxford, 109-136.

**Henrich, A. (2008)** BetP aus *Corynebacterium glutamicum*: Einfluss der Membran auf die Kälteaktivierung, Diplomarbeit, Universität zu Köln.

**Hilpert, K., Winkler, D. F. und Hancock R. E. (2007)** Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion, *Nat. Protoc.* 2, 1333-1349.

**Hillar, A., Culham, D. E., Vernikovska, Y. I., Wood, J. M., und Boggs, J. M. (2005)** Formation of an antiparallel, intermolecular coiled coil is associated with *in vivo* dimerization of osmosensor and osmoprotectant transporter ProP in *Escherichia coli*, *Biochemistry* 44, 10170-80.

**Hoischen, C. und Krämer, R. (1990)** Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*, *J. Bacteriol.* 172, 3409-3416.

**Holtmann, G., Bakker, E. P., Uozumi, N., Bremer, E. (2003)** KtrAB and KtrCD: two K<sup>+</sup> uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity, *J. Bacteriol.* 185, 1289-98.

**Inoue, H., Nojime, H. und Okayama, H. (1990)** High efficiency transformation of *E. coli* with plasmids, *Gene* 96, 23-28.

**Jakoby, M., Krämer, R. und Burkovski, A. (1999)** Nitrogen regulation in *Corynebacterium glutamicum*: isolation of genes involved and biochemical characterization of corresponding proteins, *FEMS Microbiol. Lett.* 173, 303-310.

**Jeon, J. und Voth, G. A. (2008)** Gating of the mechanosensitive channel protein MscL: The interplay of membrane and protein, *Biophys J. BioFAST*, in Druck.

**Jovanovich, S. B., Martinell, M., Record, M. T. Jr., Burgess, R. R. (1988)** Rapid response to osmotic upshift by osmoregulated genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, *J. Bacteriol* 170, 534-539.

**Jung, K. und Altendorf, K. (1998)** Individual substitutions of clustered arginine residues of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli* modulate the ratio of kinase to phosphatase activity, *J. Biol. Chem.* 273;26415-26420.

**Jung, K., Hamann, K. und Revermann, A. (2001)** K<sup>+</sup> stimulates specifically the autokinase activity of purified and reconstituted EnvZ of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 276, 40896-40902.

**Jurica, S. M., Mesecar, A., Heath, P. J., Shi, W., Nowak, T. und Stoddard, B. L. (1998)** The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate, *Structure* 6, 195-210.

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

- Kase, H. und Nakamaya, K. (1975)** L-methionine production by methionine analog resistant mutants of *Corynebacterium glutamicum*, *Agr. Bio. Chem* 39, 153-160.
- Kinoshita, S. Ukada, S. und Shimono, M. (1957)** Studies on the amino acid fermentation: I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 3, 193-205.
- Koch, A. (1983)** The surface stress theory of microbial morphogenesis. *Adv. Microbiol. Physiol* 24, 301-336.
- Koch, J. und Mahler, M. (2002)** Peptide Arrays on membrane support, *Springer Lab manual Springer*, Heidelberg.
- Krämer, R. (1994)** Functional principles of solute transport systems: concepts and perspectives, *Biochim Biophys Acta.* 1185, 1-34.
- Kruse, E., Uehlein, N. und Kaldenhoff, R. (2006)** The Aquaporins, *Gen. Biol.* 7, 206.
- Kunte, H. J., Crane, R. A., Culham, D. E., Deborah, R. and Wood, J. M. (1999)** Protein ProQ influences osmotic activation of compatible solute transporter ProP in *Escherichia coli* K12, *J. Bacteriol.* 181, 1537-1543.
- Kyhse-Andersen, J. (1984)** Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J. Biochem. Biophys. Methods* 10, 203-209.
- Laemmli U. K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.
- Leuchtenberger, W., Huthmacher, K., Drauz, K. (2005)** Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69,1-8
- Levina, N., Töttemeyer, S., Stokes, N. R., Louis, P., Jones, M. A. und Booth, I. R. (1999)** Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity, *Embo J.* 18, 1730-1737.
- Ley, O. (2001)** Bedeutung der Prolinbiosynthese bei der Osmoregulation von *Corynebacterium glutamicum*, Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Liebl, W. (2005)** *Corynebacterium* taxonomy, in *Handbook of Corynebacterium glutamicum* (Eggeling, L. und Bott, M. Herausgeber) *CRC Press*, Boca Raton, 9-31.
- Liebl, W., Bayerl, A., Schein, B., Stillner, U. und Schleifer, K. H. (1989)** High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells, *FEMS Microbiol. Lett.* 65, 299-330.
- Loqué, D., Lalonde, S., Looger, L. L., von Wirén, N. und Frommer, W. B. (2007)** A cytosolic trans-activation domain essential for ammonium uptake, *Nature* 446, 195-198.
- Lucht, J. M. und Bremer, E. (1994)** Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: Osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system ProU, *FEMS Microbiol. Rev.* 14, 3-20.



**MacMillan, S. V., Alexander, D. A., Culham, D. E., Kunte, H. J., Marshall, E. V., Rochon, D. und Wood, J. M. (1999)** The ion coupling and organic substrate specificities of osmoregulatory transporter ProP in *Escherichia coli*, *Biochim Biophys Acta.* 1420, 30-44.

**Mahmood, N. A., Biemans-Oldehinkel, E., Patzlaff, J. S., Schuurman-Wolters, G. K. und Poolman, B. (2006)** Ion specificity and ionic strength dependence of the osmoregulatory ABC transporter OpuA, *J. Biol. Chem.* 281, 29830-29839.

**McLaggen, D., Naprstek, J., Buurman, E. T. und Epstein, W. (1994)** Interdependence of K<sup>+</sup> and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 269, 1911-1917.

**Meury, J. (1994)** Immediate and transient inhibition of the respiration of *Escherichia coli* under hyperosmotic shock, *FEMS Microbiol. Lett.* 121, 281-286.

**Mileykovskaya, E. und Dowhan, W. (2000)** Visualization of phospholipid domains in *Escherichia coli* by using the cardiolipin-specific fluorescent dye 10-N-nonyl acridine orange, *J. Bacteriol.* 182, 1172-1175.

**Miller, J. H. (1992)** A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria, *Cold spring Harbour Laboratory Press*, New York.

**Möker, N., Brocker, M., Schaffner, S., Krämer, R., Morbach, S. und Bott, M. (2004)** Deletion of two genes encoding the MtrA-MtrB two-component system of *Corynebacterium glutamicum* has strong influence on cell morphology, antibiotics susceptibility and expression of genes involved in osmoprotection, *Mol. Microbiol.* 54, 420-438.

**Möker, N. (2006)** Sensing properties of MtrB-MtrA of *Corynebacterium glutamicum*: a two-component system involved in the osmo- and chill stress response, Dissertation, Universität zu Köln.

**Möker, N., Krämer, J., Uden, G., Krämer, R. und Morbach, S. (2007a)** *In vitro* analysis of the two-component system MtrB-MtrA from *Corynebacterium glutamicum*, *J. Bacteriol.* 189, 3645-3649.

**Möker, N., Reihlen, P., Krämer, R. und Morbach, S. (2007b)** Osmosensing properties of the histidine protein kinase MtrB from *Corynebacterium glutamicum*, *J. Biol. Chem.* 282, 27666-27677.

**Morbach, S. und Krämer, R. (2002)** Bodyshaping under water stress: osmosensing and osmoregulation of solute transport in bacteria, *Chem.Bio.Chem.* 3, 384-397.

**Morbach, S. und Krämer, R. (2003)** Impact of transport processes in the osmotic response of *Corynebacterium glutamicum*, *J. Biotechn.* 104, 69-75.

**Morbach, S. und Krämer, R. (2004)** Osmoregulation and osmosensing by uptake carriers for compatible solutes in bacteria, in *Molecular mechanisms controlling transmembrane report* (Boles, E. und Krämer, R., Herausgeber), *Springer*, Heidelberg, 155-177.



**Morbach, S. und Krämer, R. (2005)** Structure and function of the betaine uptake system BetP of *Corynebacterium glutamicum*: strategies to sense osmotic and chill stress, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 10,143-53.

**Mortimer, C. E. (1996)** Chemie, *Gerog Thieme Verlag*, Stuttgart.

**Mullis, K., Faldoma, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986)** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the ploymerase chain reaction, *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 51, 263-273.

**Nicklisch, S. (2005)** ESR-spektroskopische Untersuchung der Funktion der C-terminalen Domäne des Glycinbetain-Transporters BetP aus *Corynebacterium glutamicum* bei der Aktivitätsregulation, Diplomarbeit, Universität zu Köln.

**Nottebrock, D., Meyer, U., Krämer, R. und Morbach, S. (2003)** Molecular and biochemical characterization of mechanosensitive channels in *Corynebacterium glutamicum*, *FEMS Microbiol. Lett.* 218, 305-309.

**Obis, D., Guillot, A., Gripon, J.-C., Renault, P., Bolotin, A. and 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, 6238-6246.

**Ott, V (2005)** Funktion cytoplasmatischer Proteinschleifen und der C-terminalen Domäne bei der Aktivitätsregulation des Glycinbetain-Transporters BetP aus *Corynebacterium glutamicum*, Diplomarbeit, Universität zu Köln.

**Özcan, N. (2006)** Anpassung an Kältestress in *Corynebacterium glutamicum*, Dissertation Universität zu Köln.

**Özcan, N., Ejsing, C. S., Shevchenko, A., Lipski, A., Morbach, S. und Krämer, R. (2007)** Osmolality, temperature, and membrane lipid composition modulate the activity of betaine transporter BetP in *Corynebacterium glutamicum*, *J. Bacteriol.* 189, 7485-96.

**Peter, H., Burkovski, A. und Krämer, R. (1996)** Isolation, characterization and expression of the *Corynebacterium glutamicum betP* gene, encoding the transport system for the compatible solute glycine betaine, *J. Bacteriol.* 178, 5229-5234.

**Peter, H., Bader, A., Burkovski, A., Lambert, C. und Krämer, R. (1997)** Isolation of the uptake *putP* gene of *Corynebacterium glutamicum* and characterization of a low affinity uptake system for compatible solutes, *Arch. Microbiol.* 168, 143-151.

**Peter, H., Burkovski, A. und Krämer, R. (1998a)** Osmosensing by N- and C- terminal extensions of the glycine betaine Uptake system BetP of *Corynebacterium glutamicum*, *J. Biol. Chem.* 273, 2567-2574.

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

**Pflüger, K. und Müller, V. (2004)** Transport of compatible solutes in extremophiles, *J. Bioenerg. Biomembr.* 36, 17-24.

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

**Racher, K. I., Voegelé, R. T., Marshall, Culham D. E. and Wood, J. M. (1999)** Purification and reconstitution of an osmosensor: Transporter ProP of *Escherichia coli* senses and responds to osmotic shifts, *Biochemistry* 38, 1676-1684.

**Racher, K. I., Culham D. E. und Wood, J. M. (2001)** Requirements for osmosensing and osmotic activation of transporter ProP from *Escherichia coli*, *Biochemistry* 40, 7324-7333.

**Reineke, U., Kramer, A., Schneider-Mergener, J. (1999)** Antigen sequence- and library-based mapping of linear and discontinuous protein-protein-interaction sites by spot synthesis, *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 243, 23-36.

**Rigaud, J. L., Pitard, B., und Levy, D. (1995)** Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1231, 223-246.

**Romantsov, T., Helbig, S., Culham, D. E., Gill, C., Stalker, L. und Wood, J. M. (2007)** Cardiolipin promotes polar localization of osmosensory transporter ProP in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 64, 1455-1465.

**Romantsov, T., Stalker, L., Culham, D. E. und Wood, J. M. (2008)** Cardiolipin controls the osmotic stress response and the subcellular location of transporter ProP in *Escherichia coli*, *J. Biol.Chem.*, in Druck.

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

**Roth, M. G. (2004)** Phosphoinositides in constitutive membrane traffic, *Physiol Rev.* 84, 699-730.

**Rottenberg, H. (1979)** The measurement of membrane potential and pH in cells, organelles, and vesicles, *Meth. Enzymol.* 55, 547-569.

**Rübenhagen, R., Rönsch, H., Jungs, H., Krämer, R. und Morbach, S. (2000)** Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes, *J. Biol. Chem* 275, 735-741.

**Rübenhagen, R., Morbach, S. und Krämer, R. (2001)** The osmoreactive betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* is a sensor for cytoplasmic K<sup>+</sup>, *EMBO J.* 20, 5412-5420.

**Rübenhagen, R. (2001)** Der Glycinbetain-Transporter BetP aus *Corynebacterium glutamicum* als Osmosensor, Dissertation, Universität zu Köln.

**Ruffert, S., Lambert, C., Peter, H., Wendisch, V. F. und Krämer, R. (1997)** Efflux of compatible solutes in *Corynebacterium glutamicum* mediated by osmoregulated channel activity, *Eur. J. Biochem.* 247, 572-580.

**Ruffert, S., Berrier, C., Krämer, R. und Ghazi, A. (1999)** Identification of mechanosensitive ion channels in the cytoplasmatic membrane of *Corynebacterium glutamicum*, *J. Bacteriol.* 181, 1673-1679.

**Saier, M. H. Jr., Beatty, J. T., Goffeau, A., Harley, K. T., Heijne, W. H., Huang, S. C., Jack, D. L., Jahn, P. S., Lew, K., Liu, J., Pao, S. S., Paulsen, I. T., Tseng, T. T. und Virk, P. S. (1999)** The major facilitator superfamily, *Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 1, 257-279.

**Saier, M. H. Jr. (2000)** Families of transmembrane transporters selective for amino acids and their derivatives, *Microbiology* 146, 1775-1795.

**Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higushi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988)** Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science* 23, 487-491.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989)** Molecular cloning: A laboratory manual (2<sup>nd</sup> ed.), *Cold spring harbour laboratory press*, New York, USA.

**Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977)** DNA sequencing with chain terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.

**Schaffner, W. und Weissmann, C. (1973)** A rapid, sensitive and specific method for the determination of protein in dilute solution, *Anal. Biochem.* 56, 502-514.

**Schiller, D. (2004)** Osmosensorische Eigenschaften des Glycin-Betain-Transporters BetP aus *Corynebacterium glutamicum*, Dissertation, Universität zu Köln.

**Schiller, D., Krämer, R. und Morbach, S. (2004a)** Cation specificity of osmosensing by the betaine carrier BetP of *Corynebacterium glutamicum*, *FEBS Letters* 563, 108-112.

**Schiller, D., Rübenhagen, R., Krämer, R. und Morbach, S. (2004b)** The C-terminal domain of the betaine carrier BetP of *Corynebacterium glutamicum* is directly involved in Sensing K<sup>+</sup> as an osmotic stimulus, *Biochemistry* 43, 5583-5591.

**Schiller, D., Ott, V., Krämer, R. und Morbach, S. (2006)** Influence of membrane composition on osmosensing process of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum*, *J. Biol. Chem.* 281, 7737-46.

**Schmidt, T. G. M., Koepke, J., Frank, R. und Skerra, A. (1996)** Molecular interaction between the *Strep*-tag affinity peptide and its cognate target streptavidin, *J. Mol. Biol.* 255, 753-766.

**Schrader, M., Fendler, K., Bamberg, E., Gassel, M., Epstein, W., Altendorf, K. und Dröse, S. (2000)** Replacement of glycine 232 by aspartic acid in the KdpA subunit broadens the ion specificity of the K(+)-translocating KdpFABC complex, *Biophys J.* 79, 802-813.

**Sleator R. D. und Hill, C. (2001)** Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence, *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 49-71.

**Smith, M. N., Crane, R. A., Keates, R. A. und Wood, J. M. (2004)** Overexpression, purification, and characterization of ProQ, a posttranslational regulator for osmoregulatory transporter ProP of *Escherichia coli*, *Biochemistry.* 431, 2979-89.

**Spitzer, J. J. und Poolman, B. (2005)** Electrochemical structure of the crowded cytoplasm. *Trends Biochem. Sci.* 30, 536-41.

**Stallkamp, I., Dowhan, W., Altendorf, K. und Jung, K. (1999)** Negatively charged phospholipids influence the activity of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*, *Arch. Microbiol.* 172, 295-302.

**Steger, R. (2002)** Vergleichende Studien zur Aktivitätsregulation osmosensitiver Transporter aus *C. glutamicum*, Dissertation, Universität zu Köln.

**Steger, R., Weinand, M., Krämer, R. und Morbach, S. (2004)** LcoP, an osmoregulated betaine/ectoine uptake system from *C. glutamicum*, *FEBS Letters* 573, 155-160.

**Steverding, D., Thiel, C., Kadenbach, B., Capitanio, N. und Papa, S. (1989)** Influence of surface charge on the incorporation and orientation of cytochrome c oxidase in liposomes, *FEBS Lett.* 257, 131-33.

**Stumpe, S., Schlösser, M., Schleyer, M. und Bakker, E. P. (1996)** K<sup>+</sup>-circulation across the procaryotic cell membrane: K<sup>+</sup>-uptake systems; *Elsevier Science B. V. Handb. Biol. Phys.* 2, 473-499.

**Sukharev, S. I., Blount, P., Martinac, B., Blattner, F. R. und Kung, C. (1994)** A large mechanosensitive channel in *Escherichia coli* is encoded by *mscL* alone, *Nature* 368, 265-268.

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

**Sukharev, S. (2002)** Purification of the small mechanosensitive channel of *Escherichia coli* (MscS): the subunit structure, conduction, and gating characteristics in liposomes, *Biophys. J.* 83, 290-298.

**Tanghe, A., Van Dijck P. und Thevelein, J. M. (2006)** Why do microorganisms have aquaporins?, *Trends Microbiol.* 14, 78-85.

**Tøndervik, A. und Strøm (2007)** Membrane topology and mutational analysis of the osmotically activated BetT choline transporter of *Escherichia coli*. *Microbiology.* 153, 803-813.

**Towbin, H., Steahelin, T. und Gordon, J. (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 76, 4350-4354.

**Tsai, C. J., Ejsing, C. S., Shevchenko, A. und Ziegler, C. (2007)** The role of lipids and salts in two-dimensional crystallization of the glycine-betaine transporter BetP from *Corynebacterium glutamicum*, *J. Struct. Biol.* 160, 275-86.

**Tsai, H. J. (2007)** Function of interdomain  $\alpha$ -Helix in human brain hexokinase: covalent linkage and catalytic regulation between N- and C-terminal halves, *J. Biomed. Sci.* 14, 195-202.

**Tsatskis, Y., Khambati, J., Dobson, M., Bogdanov, M., Dowhan, W. und Wood, J. M. (2005)** The osmotic activation of transporter ProP is tuned by both its C-terminal coiled-coil and osmotically induced changes in phospholipid composition, *J Biol Chem.* 280, 1387-1394.

PMID: 16239220 [PubMed - indexed for MEDLINE]

**Tsatskis, Y., Kwok, S. C., Becker, E., Gill, C., Smith, M. N., Keates, R. A. B.**

- Robert, S. H. und Wood, J. M. (2008)** Core residue replacements cause coiled-coil orientation switching *in vitro* and *in vivo*: Structure-function correlations for osmosensory transporter ProP, *Biochem. 2008*, 47, 60-72.
- van der Heide, T. und Poolman, Bert (2000)** Glycine betaine transport in *Lactococcus lactis* is osmotically regulated at the level of expression and translocation activity, *J. Bacteriol.* 182, 203-206.
- van der Heide, T., Stuart, M. C. A. und Poolman, B. (2001)** On the osmotic signal and osmosensing mechanism of an ABC transport system for glycine betaine, *EMBO J.* 20, 7022-7032.
- van der Rest, M. E., Lange, C. und Molenaar, D. (1999)** A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogenic plasmid DNA, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 541-545.
- Voss, S. und Skerra, A. (1997)** Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification, *Protein Eng.* 10, 975-982.
- Weinand, M., Krämer, R. und Morbach, S. (2007)** Characterization of compatible solute transporter multiplicity in *Corynebacterium glutamicum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 701-708.
- Whatmore, A. M., Chudek, J. A. und Reed, R. H. (1990)** The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*, *J. Gen. Microbiol.* 136, 2527-2536.
- Wolf, A., Krämer, R. und Morbach, S. (2003)** Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and their significance in response to osmotic stress, *Mol. Microbiol.* 49, 1119-1134.
- Wood, J. M. (1999)** Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 230-262.
- Wood, J. M. (2006)** Osmosensing by bacteria, *Sci STK* 17, 43-47.
- Wood, J. M. (2007)** Bacterial Osmosensing Transporters, *Methods Enzymol.* 478, 77-107.
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D. und Somero, G. N. (1982)** Living with water stress: evolution of osmolyte systems, *Science.* 217, 1214-22.
- Ziegler, C., Morbach, S., Schiller, D., Krämer, R., Tziatzios, C., Schubert, D. und Kühlbrandt, W. (2004)** Projection structure and oligomeric state of the osmoregulated sodium/glycine betaine symporter BetP of *Corynebacterium glutamicum*, *J. Mol. Biol.* 337, 1137-1147.
- Zimmann, P., Steinbrügge, A., Schniederberend, M., Jung, K. und Altendorf, K. (2007)** The extension of the fourth transmembrane helix of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli* is involved in sensing, *J. Bacteriol.* 189, 7326-7334.
- Zimmermann, J., Voss, H., Schwager, C., Stegemann, J., Erfle, H., Stucky, K., Kristensen, T. und Ansorge, W. (1990)** A simplified protocol for fast plasmid DNA sequencing, *Nucleic Acids Res.* 18, 105-109.

### Danksagung

Herrn Professor Dr. Reinhard Krämer danke ich für die Überlassung des interessanten und herausfordernden Themas, für die vielen intensiven und aufschlussreichen Besprechungen und sein stetiges Interesse am Fortschritt der Arbeit.

Ich danke Herrn Professor Dr. Ulf-Ingo Flügge für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Für zwei Jahre tolle Betreuung vor Ort und ein Jahr Fernbetreuung trotz Nele gilt mein besonderer Dank PD Dr. Susanne Morbach, die mit Ruhe und Souveränität auch nach Rückschlägen immer eine konstruktive Idee und ein aufmunterndes Wort für mich hatte.

Dr. Christine Ziegler und Susanne Ressler danke ich für die zahlreichen, interessanten BetP-Diskussionen und den unkomplizierten Informationsaustausch. Der Einblick in die Strukturdaten hat ganz sicher zur Bereicherung meiner Arbeit beigetragen.

PD Dr. Joachim Koch danke ich für die Bereitstellung der *peptide array* Membranen und die Interpretationshilfe beim Auswerten der Daten.

Dr. Kira Späte gilt ein besonderes Dankeschön für ihre Hilfe und unermüdliche Geduld bei den SPR-Messungen... „Was hat das jetzt schon wieder zu bedeuten?“

Vielen Dank der ganzen AaaaaaGeeeee Krämer sowie den Osmos und Ex-Osmos (Nina, wir haben Dich nicht vergessen!) im Speziellen für das unschlagbare Arbeitsklima im Krämer-Lab und dafür, dass Hilfsbereitschaft, Loyalität und Humor (mit schwankendem Niveau) zu jeder Zeit eine Selbstverständlichkeit waren. Die Gewissheit, mindestens einmal am Tag zum Lachen gebracht zu werden, war vor allem zu wissenschaftlichen Tiefzeiten eine effektive allmorgendliche Aufstehhilfe. Es kann nur schlechter werden nach Euch!

Insbesondere danke ich Sascha für vier Jahre harmonisches miteinander Forschen mit allen Höhen und Tiefen einer beispielhaften Laborehe ;-) und vor allem für seine Geduld mit meiner „eigenen Ordnung“ und der Aushilfe mit  $KP_i$ -Puffer im Dauernotstand.

Elena sei gedankt für unsere (vergebliche) Suche nach dem Sinn des Lebens während der gefühlten 50 000 Isolabstunden und natürlich für die Ausdauer beim Korrekturlesen.

Markus danke ich für das Aufstoßen der Tür zur Kaliumschatzkammer (Mal sehen ob auch einer drin ist?) und den Messungen am Flammphotometer. An dieser Stelle sei auch Kay für seine offensive Diskussionsbereitschaft in Sachen Kalium (nebst anderen weltpolitischen Fragen) gedankt.

Ein Dankschön an Marc für die Anregungen zur Aufwertung meiner Diskussion.

Vielen Dank auch an Jens für's Korrekturlesen... Nein, ein Transporter muss nicht immer vier Räder haben!

Meinem Leidensgenossen Martin danke ich für den fachlichen und organisatorischen Informationsaustausch sowie das gegenseitige Aufbauen im zähen Schreiballtag. Jetzt haben wir es bald geschafft, Martin :-)! !

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir dieses Studium ermöglicht 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. R. Krämer am Institut für Biochemie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln betreut worden.

### Teilpublikation:

**Schiller, D., Ott, V., Krämer, R. und Morbach, S. (2006)** Influence of membrane composition on osmosensing process of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum*, *J. Biol. Chem.* 281, 7737-46.

Datum: Köln, Mai 2008

Unterschrift:

## Lebenslauf

Vera Ott ♦ Paul-Schallück-Straße 7 ♦ 50939 Köln

### Vera Magdalena Ott

#### Persönliche Daten:

- Geburtsdatum: 22.07.1979
- Geburtsort: Neuwied am Rhein
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Familienstand: ledig

#### Schulbildung:

- 1986-1990: Grundschule Krufft
- 1990-1999: Bertha-von-Suttner-Gymnasium Andernach
- Abschluss: Abitur

#### Studium:

- 10/1999-03/2005: Studium der Biologie an der Universität zu Köln
- Abschluss: Diplom

#### Promotion:

- 05/2005-07/2008: Promotion am Institut für Biochemie der Universität zu Köln;  
Arbeitsgruppe: Prof. Dr. R. Krämer