

**Analyse der physikalischen Stimuli des
osmoregulierten Transporters BetP
aus *Corynebacterium glutamicum***

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

Stanislav Maximov
aus Vladimir

Köln, 2013

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: 02. Juli 2013

Kurzzusammenfassung

Kurzzusammenfassung

Der sekundär aktive Glycinbetaintransporter BetP aus *Corynebacterium glutamicum* zeichnet sich durch die Eigenschaften eines Sensors und eines Regulators aus. Sowohl in Zellen als auch in Proteoliposomen reagiert das Protein bei der Steigerung der externen Osmolalität mit Beschleunigung der Betainaufnahme. Die BetP-Aktivierung in Vesikeln konnte auf die Erhöhung der internen K^+ -Konzentration zurückgeführt werden. Die BetP-Stimulierung durch die Steigerung der cytoplasmatischen K^+ -Konzentration wurde ebenfalls in *C. glutamicum*-Zellen nachgewiesen und in dieser Arbeit ausführlich untersucht. Die seit langer Zeit vermutete Interaktion von BetP mit K^+ wurde mithilfe der Röntgenkristallographie bestätigt. Die Analyse der K^+ -bedingten BetP-Aktivierung *in vivo* und *in vitro* demonstrierte, dass die Bindung von K^+ an BetP einen stark kooperativen Charakter hat. Allerdings wurde durch die separate Applikation unterschiedlicher natürlicher und artifizierlicher BetP-Stimuli (K^+ , hyperosmotischer Schock und amphipathische Verbindungen) in *C. glutamicum*-Zellen demonstriert, dass der Transporter neben des K^+ -assoziierten mindestens einen weiteren, K^+ -unabhängigen Stimulus perzipieren muss, um die maximale Betainimportrate *in vivo* zu erreichen. Der alternative Stimulus ist wahrscheinlich mit der Veränderung der physikalischen Parameter der Membran (z.B. des lateralen Membrandrucks) assoziiert. Letzterer BetP-Stimulus wurde bei früheren Untersuchungen in Proteoliposomen nicht beobachtet. Dies warf die Frage nach dem Aktivierungszustand des Carrierproteins in Vesikeln auf. Um diese Frage zu beantworten, wurde die molekulare BetP-Aktivität in Zellen und in Vesikeln verglichen. Die immunologische Bestimmung der BetP-Konzentration in Zellextrakten von *E. coli* sowie die Aktivitätstiteration zur Abschätzung des Anteils der aktiven BetP-Moleküle in Proteoliposomen ermöglichte die Berechnung der Wechselzahl von BetP *in vivo* und *in vitro*. Die molekulare Aktivität von BetP in Proteoliposomen war mit der in Zellen bei voller Stimulierung vergleichbar. Außerdem war die Wirkung der amphipathischen Verbindung Tetracain auf das Aktivierungspofil von BetP in Proteoliposomen und in *C. glutamicum*-Zellen bei hyperosmotischen Bedingungen sehr ähnlich. Demzufolge hat BetP *in vitro* maximale Transportaktivität, was wiederum bedeutet, dass der alternative, K^+ -unabhängige Stimulus in Vesikeln permanent wirksam ist.

Abstract

Abstract

The secondary active glycine betaine transporter BetP of *Corynebacterium glutamicum* comprises also functions of a sensor and a regulator. In both cells and proteoliposomes the protein responds to elevation of the external osmolality with an increased transport rate. The activation of BetP in vesicles could be attributed to the increase of the internal K^+ concentration. Also in intact cells BetP was found to be stimulated by the rise of the cytoplasmic K^+ level. The presumed interaction of BetP and K^+ was confirmed by X-ray crystallography and the study of the K^+ -related activation of BetP demonstrated that the binding of K^+ to BetP occurs in a strongly cooperative manner. However, the separate application of both natural and artificial BetP activators (K^+ , hyperosmotic shock and amphipathic compounds) in *C. glutamicum* cells demonstrates that besides the K^+ -associated one BetP perceives at least one additional Stimulus (K^+ -independent) to reach the maximal transport activity. The alternative stimulus of BetP is probably associated with an alteration of physical parameters of the plasma membrane (e.g. lateral membrane pressure). Due to the fact that the latter stimulus was not observed in proteoliposomes in previous experiments, the question about the activation state of reconstituted BetP was raised. To study this question BetP activity was analysed in cells and vesicles. The immunologic determination of BetP concentration in cell extracts of *E. coli* cells and as well as a newly developed technique for estimation of the percentage of active reconstituted BetP allowed calculation of the turnover number of BetP *in vivo* and *in vitro*. The molecular activity of BetP in both systems was comparable. Also the effect of the amphipath tetracaine on the activation profile of BetP in proteoliposomes was closely similar to the activation profile of BetP in cells exposed to hyperosmotic stress. Consequently, we conclude that BetP is fully active in proteoliposomes, which in turn means that the alternative K^+ -independent Stimulus is effective in vesicles.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Osmotische Eigenschaften einer Zelle	1
1.2 Hyperosmotischer Stress	2
1.3 Kompatible Solute und ihre Aufnahme in <i>C. glutamicum</i>	3
1.4 BetP als Osmosensor	5
1.5 Ziele der Arbeit	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Bakterienstämme und Plasmide	13
2.2 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	14
2.2.1 Nährmedien für <i>E. coli</i>	14
2.2.2 Nährmedien für <i>C. glutamicum</i>	14
2.2.3 Medienzusätze	16
2.2.4 Kultivierungsbedingungen der Bakterien	16
2.3 Molekularbiologische Techniken	16
2.3.1 Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i>	16
2.3.2 Herstellung transformationskompetenter <i>C. glutamicum</i>	17
2.3.3 Transformation von <i>E. coli</i>	18
2.3.4 Transformation von <i>C. glutamicum</i>	18
2.4 Allgemeine analytische Methoden	18
2.4.1 Proteinbestimmung	18
2.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	19
2.4.3 Immunologischer Nachweis von BetP	19
2.4.5 Bestimmung der Osmolalität	22
2.4.6 Bestimmung der intrazellulären K ⁺ -Konzentrationen in <i>C. glutamicum</i>	22
2.4.7 Messung der Proteoliposomengröße mittels dynamischer Lichtstreuung	23

Inhaltsverzeichnis

2.5 Biochemische Methoden	24
2.5.1 Membranpräparation	24
2.5.2 Isolierung von Strep-BetP C252T	24
2.5.3 Herstellung von Liposomen.....	26
2.5.4 Rekonstitution von Strep-BetP C252T in Liposomen.....	26
2.5.5 Variation der Lipid- oder Pufferzusammensetzung der Proteoliposomen	27
2.5.6 Bestimmung der Phospholipidkonzentration.....	28
2.6 Radiochemische Transportmessungen	28
2.6.1 Synthese von [¹⁴ C]-Glycinbetain.....	28
2.6.2 Messung der Glycinbetain-Aufnahme in <i>C. glutamicum</i>	29
2.6.3 Messung der Glycinbetain-Aufnahme in <i>E. coli</i>	31
2.6.4 Messungen der Glycinbetain-Aufnahme in Proteoliposomen.....	31
3. Ergebnisse	33
3.1 Differenzierte BetP-Stimulierung in <i>C. glutamicum</i>-Zellen. Demonstration des K⁺-unabhängigen Stimulus <i>in vivo</i>.	33
3.1.1 Differenzierte BetP-Stimulierung in <i>C. glutamicum</i> DHPF (pBetP)-Zellen.....	33
3.1.2 Differenzierte BetP-Stimulierung in <i>C. glutamicum</i> $\Delta cglk/\Delta kup$ -Zellen und in <i>C. glutamicum</i> DHPF (pBetP $\Delta C25$)-Zellen.	37
3.1.3 Differenzierte BetP-Stimulierung in <i>C. glutamicum</i> -Zellen: Zusammenfassung. .	39
.....	39
3.2 Einfluss der amphipathischen Verbindungen auf die BetP-Aktivität in intakten Zellen und Proteoliposomen	41
3.2.1 Einfluss von Lysophosphatidylcholin auf die BetP-Aktivität in intakten Zellen und in Proteoliposomen.	42
3.2.2 Einfluss von Tetracain auf die BetP-Aktivität in intakten Zellen und in Proteoliposomen.	47
3.3 Charakterisierung des Aktivierungszustands von BetP in intakten Zellen und in Proteoliposomen	57

Inhaltsverzeichnis

3.3.1	Bestimmung der molekularen Aktivität von BetP in <i>E. coli</i> MKH13 (pBetP)-Zellen	58
3.3.1	Bestimmung der molekularen Aktivität von BetP in Proteoliposomen	63
3.4	Untersuchung der K⁺-Bindung an BetP	69
3.4.1	Untersuchung der K ⁺ -Bindung an BetP in <i>C. glutamicum</i> DHPF (pBetP)-Zellen.	69
3.4.2	Untersuchung der K ⁺ -Bindung an BetP in Proteoliposomen	73
3.4.3	Untersuchung der K ⁺ -Bindung an BetP: Zusammenfassung	75
4.	Diskussion.....	77
4.1	Untersuchung der K⁺-Bindung an BetP	77
4.2.	BetP wird in lebenden Zellen durch zwei unterschiedliche Stimuli aktiviert.....	80
4.3	Der Aktivierungszustand von BetP in Proteoliposomen.....	86
5.	Zusammenfassung.....	94
6.	Abkürzungsverzeichnis	96
7.	Literaturverzeichnis	98

1. Einleitung

Mikroorganismen sind in ihren natürlichen Habitaten vielen biotischen und abiotischen Stressfaktoren ausgesetzt. Die Organismen der oberen Bodenschichten sind mit häufigen Fluktuationen der Temperatur, des pH-Werts und der Osmolalität konfrontiert. Um bei diesen sich schnell ändernden Bedingungen zu überleben und zu proliferieren, müssen Bakterien effektive Schutzmechanismen besitzen (Bremer und Krämer, 2000; Galinski und Trüper, 1994; Hecker und Völker, 2001; Wood, 1999). In dieser Arbeit soll die Regulation eines der Schutzmechanismen gegen den hyperosmotischen Stress im Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum* untersucht werden.

1.1 Osmotische Eigenschaften einer Zelle

Osmose ist eine passive Bewegung von Lösungsmittelmolekülen entlang ihres Aktivitätsgradienten durch eine semipermeable Membran. In Organismen fungiert Wasser als Lösungsmittel, während die Phospholipiddoppelschicht eine biologische semipermeable Membran darstellt. Diese Membran trennt das Innere einer Zelle, also das Cytoplasma, von ihrer Umgebung ab und wird daher als Cytoplasmamembran bezeichnet. Die Phospholipiddoppelschicht ist impermeabel für geladene und polare Moleküle, während Wasser und kleine ungeladene Teilchen wie z.B. Gase durch sie frei diffundieren können.

Das chemische Potential des Wassers (Ψ_W) ist eine thermodynamische Größe, die in der Einheit Pascal [Pa] eingegeben wird. Es setzt sich aus dem osmotischen bzw. dem Konzentrationspotential Ψ_π und dem Druck- oder Turgorpotential Ψ_P einer Lösung zusammen. Es gilt der in Gleichung (1) dargestellte Zusammenhang.

$$\Psi_W = \Psi_\pi + \Psi_P \quad (1)$$

Der Turgordruck (Ψ_P) ist der Druck, den die Plasmamembran auf die Zellwand ausübt. Das osmotische Potential (Ψ_π) hängt von der Menge der im Wasser gelösten Solute ab und lässt sich durch die Van't Hoff'sche Gleichung (2) beschreiben:

Einleitung

$$\Psi_{\pi} = -RT c_s \quad (2)$$

R ist die ideale Gaskonstante, **T** die absolute Temperatur, während **c_s** die Solutkonzentration ist. Erhöht sich die Solutkonzentration im Wasser, so wird das osmotische Potential Ψ_{π} kleiner (2). Normalerweise ist die Solutkonzentration im Cytoplasma einer Zelle höher als im umgebenden Medium, womit das osmotische Potential des Cytoplasmas niedriger als das des Mediums ist. Die Wassermoleküle strömen entlang ihres Konzentrationsgradienten in die Zelle und bauen einen positiven Druck auf die Zellwand auf, die sich elastisch ausdehnt und einen Gegendruck ausübt. Sind diese beiden Drücke gleich, stoppt der Wassereinstrom und die Zelle ist voll turgeszent. Der Turgordruck beträgt in Gram-negativen Bakterien 1 bis 5 atm, während er in Gram-positiven Bakterien 15 bis 25 atm erreichen kann (Poolman und Glaasker, 1998). Da das Wasserpotential des umgebenden Mediums sich oft ändert, sind Bakterien entweder einem Wassereinstrom oder einem Wasserverlust ausgesetzt. Dies führt zu Turgoränderungen. Die strikte Regulation des Turgors ist jedoch für eine Bakterienzelle lebensnotwendig, da er die mechanische Kraft für die Ausdehnung der Zellwand und somit die Voraussetzung für Zellwachstum ist (Koch, 1983). Deshalb müssen die Zellen ihre cytoplasmatische Solutkonzentration und somit das Wasserpotential an die externen osmotischen Bedingungen anpassen, um den Turgor effektiv regulieren zu können.

1.2 Hyperosmotischer Stress

Ist der osmotische Druck des externen Mediums höher als der des Cytoplasmas, so strömt Wasser aus der Zelle aus. Diese Situation wird als hypersomotischer Stress bezeichnet. Der Wasserausstrom aus dem Cytoplasma führt zur Erhöhung der Ionenstärke und der Viskosität des Cytoplasmas, zum Turgorabfall und zur Plasmolyse. Der Wasserverlust und die zunehmende Ionenkonzentration können einen teilweisen bis völligen Funktionsverlust der Enzyme durch den Verlust ihrer Hydrathülle und Denaturierung hervorrufen. Um sich vor hyperosmotischem Stress zu schützen, müssen die Zellen ihre interne Osmolalität erhöhen, um die Rehydrierung des Cytoplasmas zu ermöglichen. Die Erhöhung der cytoplasmatischen Osmolalität erfolgt durch die Aufnahme von anorganischen Ionen wie K^+ und Cl^- oder durch die Aufnahme von kompatiblen Soluten. Die erste Strategie, die man als *salt-in* bezeichnet, wird hauptsächlich von halophilen Archaea und Bakterien bevorzugt, die extrem saline Habitate besiedeln. Die Enzyme dieser Mikroorganismen haben sich im Laufe der Evolution

Einleitung

an die extrem hohen Salzkonzentrationen von bis zu 7M im Außenmedium angepasst. Bei Ionenstärken, die für mesophile Bakterien tolerierbar sind, kann es allerdings zum Funktionsverlust dieser Enzyme kommen. Daher können die halophilen Mikroorganismen nur in hochsalinen Habitaten überleben (Galinski und Trüper, 1994). Mesophile Bakterien, deren Physiologie bei hohen Ionenkonzentrationen beeinträchtigt werden kann, bevorzugen dagegen die *salt-out* Strategie, die aus zwei Phasen besteht. Unmittelbar nach dem Beginn des hyperosmotischen Schocks kommt es zu einer schnellen Aufnahme von K^+ (Cayley und Record, 2003; Dinnbier *et al.*, 1988; McLaggan *et al.*, 1994; Wolf *et al.*, 2003). Dann wird K^+ durch kompatible Solute ersetzt, um eine dauerhafte Zunahme der intrazellulären Ionenstärke zu vermeiden.

1.3 Kompatible Solute und ihre Aufnahme in *C. glutamicum*

Kompatible Solute sind kleine organische Moleküle, die ungeladen sind oder keine Nettoladung besitzen. Die häufigsten kompatiblen Solute, die von Bakterien verwendet werden, sind Glycinbetain, Prolin, Ectoin oder Trehalose (Bremer und Krämer, 2000). Ihre Strukturformeln sind in Abbildung 1.1 dargestellt.

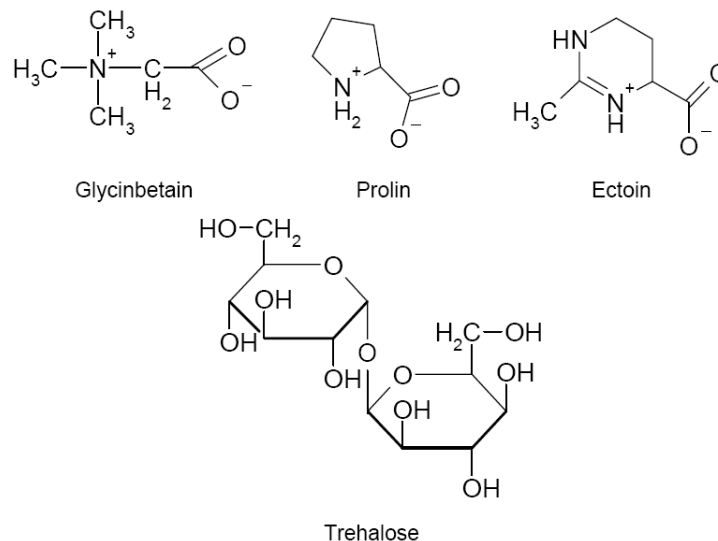


Abbildung 1.1: Strukturformeln von kompatiblen Soluten in Bakterien

Für den Schutz gegen hyperosmotischen Stress haben diese Verbindungen zwei wichtige Eigenschaften. Erstens können kompatible Solute in Konzentrationen über 1 M in der Zelle

Einleitung

angereichert werden, ohne dabei den Stoffwechsel zu beeinträchtigen (Brown, 1976). Sie erhöhen die Osmolalität des Cytoplasmas, ohne dabei die Ionenstärke des Cytoplasmas zu erhöhen, was einen Wassereinstrom in die Zelle induziert. Zweitens interagieren sie im Gegensatz zu chaotropen Verbindungen nicht mit dem Peptidrückgrat der Proteine wodurch sie die native Proteinstruktur stabilisieren (Rösgen, 2007). Diesen Effekt nennt man *preferential exclusion*.

C. glutamicum kann die kompatiblen Solute Prolin, Trehalose, Glutamat und Glutamin synthetisieren (Ley, 2001; Rösch *et al.*, 2003; Wolf *et al.*, 2003). Die Synthese dieser Moleküle spielt eine wichtige Rolle bei der Langzeitadaptation der Zellen an hyperosmotische Bedingungen. Sind jedoch kompatible Solute im Außenmedium vorhanden, so wird ihre Aufnahme der Synthese gegenüber aus energetischen Gründen bevorzugt. Manche Solute können jedoch nicht synthetisiert, sondern nur aufgenommen werden (z.B. Betain und Ectoin). *Corynebacterium glutamicum* besitzt vier Aufnahmesysteme für kompatible Solute, deren Eigenschaften in Tabelle 1.1 aufgelistet sind.

Tabelle 1.1: Aufnahmesysteme für kompatible Solute in *C. glutamicum* und ihre katalytischen Eigenschaften (Peter *et al.*, 1997; Peter *et al.*, 1998b; Steger *et al.*, 2004). MFS: Major Facilitator Superfamily, BCCT: Betain/Carnitin/Cholin-Transporter. ZTM: Zelltrockenmasse

Transporter (Familie)	Substrat/ Co-Substrat	K_M [μM]	V_{\max} [$\text{nmol} \times (\text{min} \times \text{mg ZTM})^{-1}$]	Aktivitätsoptimum [osmol/kg]
BetP (BCCT)	Betain/ Na^+	$8,6 \pm 0,4$	110	1,3
	Ectoin/ Na^+	$63 \pm 4,9$	27	
EctP (BCCT)	Betain/ Na^+	333 ± 45	34	1,3
	Prolin/ Na^+	1200 ± 180	34	
LcoP (BCCP)	Betain/ Na^+	154 ± 15	8,5	1,6
	Ectoin/ Na^+	539 ± 41	8,6	
ProP (MFS)	Prolin/ H^+	48	71	1,3
	Ectoin/ H^+	132	129	

Die drei Transportproteine BetP, EctP und LcoP gehören zur Familie der BCC-Transporter (*betaine-choline-carnitin-transporter*), die den Transport von Substraten mit einer quaternären Ammoniumgruppe katalysieren. ProP dagegen wird der MSF (*major facilitator superfamily*) zugeordnet. Die Transporter unterscheiden sich nicht nur in ihren katalytischen Parametern, sondern auch bezüglich ihrer Substratspezifität (s. Tabelle 1.1). Alle diese Transportproteine sind Symporter. Die Substrataufnahme durch BetP, EctP und LcoP wird

Einleitung

durch den exergonen Natriumsymport energetisiert. Die Energie für den Substratimport durch ProP wird an die exergone Protonenaufnahme gekoppelt. Dies ermöglicht die Aufnahme verschiedener kompatibler Solute, die in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen können. BetP ist unter anderem wegen der Spezifität zu seinem Substrat Glycinbetain sowie relativ starker Affinität (K_M : 8,6 μM) und hoher maximaler Transportrate (V_{\max} : 110 $\text{nmol} \times (\text{min} \times \text{mg ZTM})^{-1}$) interessant. Dieser Transporter ist der zentrale Bestandteil dieser Untersuchung und soll daher ausführlicher beschrieben werden.

1.4 BetP als Osmosensor

Die Betain-Permease BetP ist ein Transmembranprotein, das aus 595 Aminosäuren besteht und eine Molekülmasse von 64,2 kDa besitzt. Das Protein besitzt 12 Transmembrandomänen und bildet ein Homotrimer in der Membran. BetP zeichnet sich durch eine negativ geladene N-terminale und eine positiv geladene C-terminale Extension aus, die jeweils etwa 55-60 Aminosäuren umfassen und beide im cytoplasmatischen Raum liegen (Peter *et al.*, 1996; Rübenhagen *et al.*, 2001). Die 3D-Struktur von N-terminal verkürztem BetP wurde 2009 aufgelöst (Ressl *et al.*, 2009) und ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

BetP nimmt sein einziges Substrat Glycinbetain im Symport mit zwei Na^+ -Ionen auf und kann dabei gegen einen sehr großen Konzentrationsgradienten arbeiten. Betain kann bis zu einem Verhältnis von 4×10^6 akkumuliert werden (Farwick *et al.*, 1995). Außer der Transportaktivität weist BetP zusätzlich Sensor- und Regulatoreigenschaften auf. Das Protein ist in der Lage, hyperosmotischen Stress zu detektieren und seine eigene Aktivität in Abhängigkeit der externen Osmolalität zu regulieren (Peter *et al.*, 1996; Rübenhagen *et al.*, 2001). BetP wird bei einer externen Osmolalität von etwa 0,3 osmol/kg aktiviert und erreicht seine V_{\max} bei ca. 1,2 osmol/kg. Bei höheren externen Osmolalitäten nimmt die Transportaktivität von BetP ab (Peter *et al.*, 1996, 1998b). Die regulierte Transportaktivität wird auch nach der Rekonstitution von gereinigtem BetP in Liposomen beobachtet (Rübenhagen *et al.*, 2000). Dies bedeutet, dass kein zusätzlicher Proteinfaktor für die Funktion und Regulation von BetP benötigt wird. Es sind auch andere Transporter bekannt, die gleichzeitig als Osmosensoren und Osmoregulatoren fungieren. Beispiele hierfür sind ProP aus *E. coli* (Racher *et al.*, 2001) und OpuA aus *Lactococcus lactis* (Van der Heide *et al.*, 2001).

Einleitung

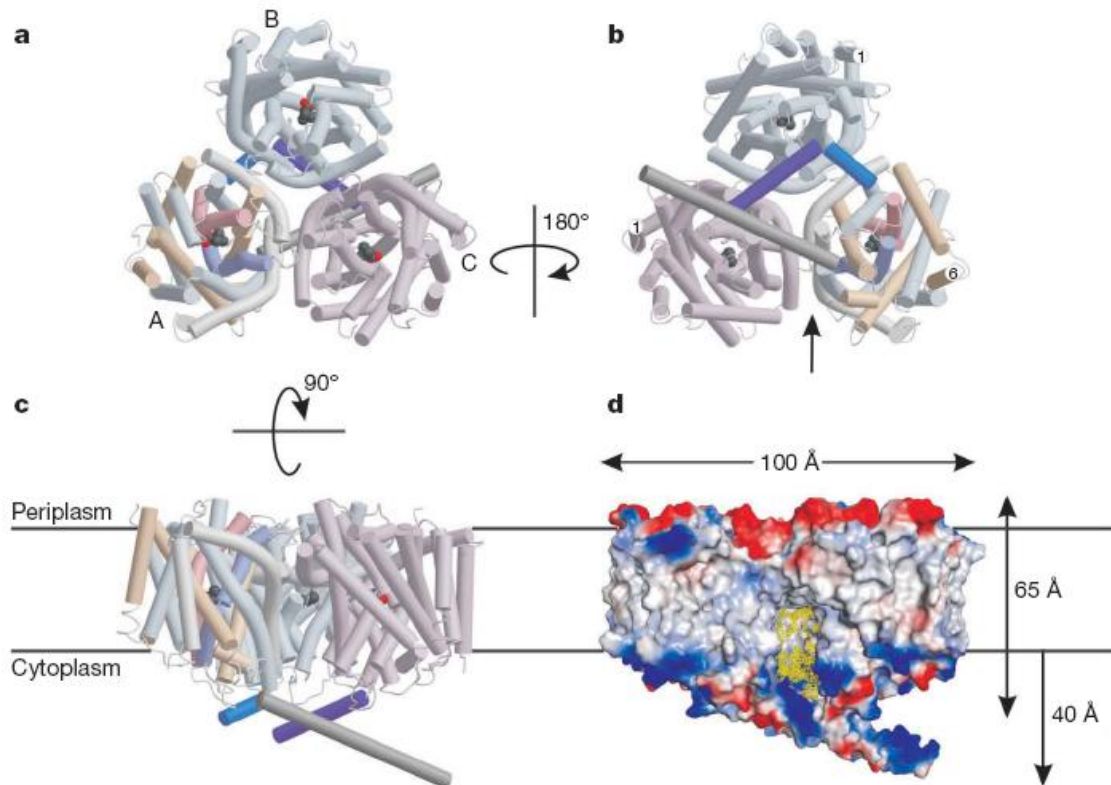


Abbildung 1.2 : 3D-Struktur von N-terminal verkürztem BetP-Homotrimer. Der Transporter liegt in der Membran als ein Homotrimer vor. Das Monomer A ist bis Ser 589, das Monomer B bis Arg 558 und das Monomer C bis Arg 568 aufgelöst. a: periplasmatische Ansicht, b: cytoplasmatische Ansicht, c: Seitenansicht, d: Seitenansicht mit Größenangaben. Das Protein wurde im *occluded state* mit gebundenem Substrat Betain kristallisiert (Ressl *et al.*, 2009).

Die Untersuchung der Parameter, die einen Einfluss auf die BetP-Aktivierung und -Regulation haben, erfolgte sowohl in lebenden Zellen als auch in Proteoliposomen. Es stellte sich heraus, dass K^+ eine wichtige Rolle für die BetP-Stimulierung bei hyperosmotischen Bedingungen spielt. Hierbei strömt Wasser aus der Zelle und die intrazelluläre Konzentration von K^+ sowie anderer Solute steigt (Botzenhardt, 2004; Wood, 1999). Es wurde nachgewiesen, dass BetP bei der Erhöhung der Kaliumkonzentration im Proteoliposomenlumen aktiviert wird und bei ca. 350 - 450 mM maximale Aktivität erreicht (Rübenhagen, 2001; Schiller *et al.*, 2004). Ein ähnlicher Effekt wurde auch *in vivo* beobachtet. Die Zunahme der intrazellulären K^+ -Konzentration korrelierte ebenfalls mit steigender Betainimportrate in *C. glutamicum* (Ott, 2008). Auch weitere Elemente aus derselben Hauptgruppe, Cs^+ und Rb^+ , die einen ähnlichen Ionenradius besitzen, zeigten den gleichen Effekt. Dagegen hatten Na^+ und NH_4^+ nur unwesentliche Auswirkungen auf die BetP-Stimulierung. Somit kann BetP als ein Chemosensor betrachtet werden (Rübenhagen *et al.*, 2001). Diese Spezifität wurde bei den Transportern ProP und OpuA nicht beobachtet:

Einleitung

ProP wird vermutlich durch die Veränderung seines Hydratationsstatus aktiviert (Wood, 2006), während OpuA durch die Erhöhung der Ionenstärke stimuliert wird (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006).

Die Regulation der BetP-Aktivität bei hyperosmotischen Bedingungen hängt außerdem von der Ladung der Membranoberfläche ab. Bei der heterologen Expression von BetP in *E. coli*-Zellen erreichte das Transportprotein seine maximale Aufnahmezeit bei niedrigerer externer Osmolalität als in seinem homologen Organismus *C. glutamicum* (Peter *et al.*, 1998; Rübenhagen *et al.*, 2000). Die Plasmamembran von *E. coli* besteht zu etwa 20-25 % aus Phospholipiden, deren Kopfgruppen negativ geladen sind, während die restlichen Kopfgruppen keine netto Ladung besitzen (Tsatskis *et al.*, 2005). Dagegen zeichnet sich die Membran von *C. glutamicum* durch einen sehr hohen Gehalt von über 90 % an negativ geladenen Phospholipidkopfgruppen aus (Hoischen und Krämer, 1990; Özcan *et al.*, 2007). Die Auswirkung der Membranoberflächenladung auf die BetP-Regulation wurde auch in Proteoliposomen nachgewiesen. Hierzu wurde BetP in Liposomen aus *E. coli*-Phospholipidextrakt rekonstituiert. Bei der Erhöhung des Anteils von sauren Phospholipiden in den Proteoliposomen verschob sich das Aktivitätsoptimum von BetP in Richtung höherer externer Osmolalitäten (Schiller *et al.*, 2006). Die Abhängigkeit der Aktivitätsregulation vom Anteil negativer Phospholipide in der Membran wurde auch für ProP und OpuA nachgewiesen (Romantsov *et al.*, 2008; van der Heide *et al.*, 2001).

Eine wichtige Rolle bei der Kaliumsensorik von BetP spielt die C-terminale Extension, die aus den letzten 50-55 Aminosäuren besteht und eine α -helikale Struktur im zentralen Bereich besitzt (s. Abbildung 1.2). Die Deletion der letzten 25 Aminosäuren der C-terminalen Domäne führt zum Verlust der BetP-Regulation unter hyperosmotischen Bedingungen. Das Protein weist permanente Transportaktivität auf, die jedoch signifikant niedriger ist als die V_{\max} von Wildtyp-BetP in *C. glutamicum* (Schiller, 2004). Die komplette Deletion der C-terminalen Domäne führt zum Aktivitätsverlust von BetP (Peter *et al.*, 1998). Der sukzessive Austausch von einzelnen Aminosäuren im C-terminalen Bereich gegen Prolin oder Alanin zeigte, dass sowohl die Konformation als auch die positiv geladenen Seitenketten der C-terminalen Extension im Bereich von 550-572 Aminosäuren für die Regulation der BetP-Aktivität bei hyperosmotischen Bedingungen essenziell sind (Ott *et al.*, 2008; Schiller *et al.*, 2006). Der Bereich der C-terminalen Extension, in dem Mutationen Regulationsstörungen der BetP-Aktivität verursachen, hängt vom Organismus ab, in dem BetP synthetisiert wird.

Einleitung

Bei homolog überexprimiertem BetP in *C. glutamicum* war dieser Bereich länger als bei BetP, welches in *E. coli* heterolog überexprimiert wurde. Außerdem zeigte die Oberflächenplasmonresonanz-Untersuchung eine Interaktion der C-terminalen Extension mit negativ geladenen Membranoberflächen. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Konformation der C-terminalen Extension durch die negativ geladene Membranoberfläche, wie in *C. glutamicum*-Zellen, stabilisiert werden könnte (Ott *et al.*, 2008). Im früheren Aktivierungsmodell wurde vorgeschlagen, dass die positiv geladene C-terminale Domäne mit der Membranoberfläche elektrostatisch interagiert und dabei BetP im inaktiven Zustand hält. Diese Interaktion wird bei der Konzentrationserhöhung von K^+ an der Membran gestört, da K^+ vermutlich mit der C-terminalen Extension wechselwirkt, wodurch sich die letztere von der Membran ablöst, was wiederum BetP in den aktiven Zustand versetzt (Abbildung 1.3).

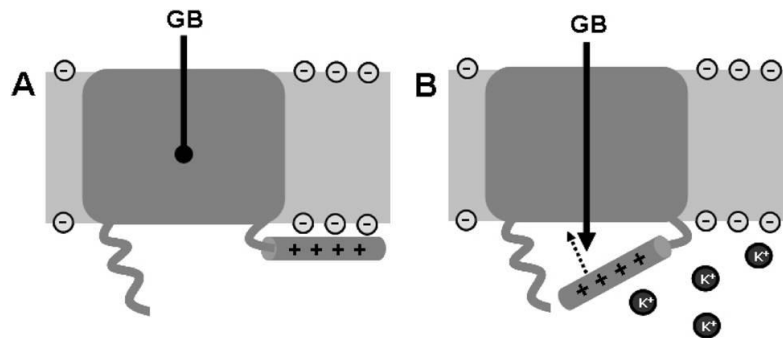


Abbildung 1.3 : Funktionelles Modell der Beteiligung der C-Domäne an der BetP-Aktivierung. A: BetP im inaktiven Zustand; B: BetP im aktiven Zustand; GB: Glycinbetain. (Ott *et al.*, 2008).

Daraus folgt, dass die für die BetP-Aktivierung benötigte Kaliumkonzentration mit einer zunehmenden Dichte negativer Ladungen an der Membranoberfläche steigt (Ott *et al.*, 2008). Das oben dargestellte BetP-Aktivierungsmodell wird allerdings durch die Kristallstruktur nicht unterstützt (Abbildung 1.2). Es wird zwar vermutet, dass die C-terminale Domäne sich parallel zur Membranoberfläche bewegen kann, doch diese Bewegung ist wahrscheinlich wegen der Interaktionen der C-Domäne mit den cytoplasmatischen Bereichen des benachbarten Protomers eingeschränkt (Ressl *et al.*, 2009). Es muss jedoch erwähnt werden, dass für die Kristallisation verwendetes BetP $\Delta N29$ E44A E45A E46A, das in *E. coli* heterolog überexprimiert wurde, in intakten *E. coli*-Zellen nicht reguliert ist. Das Protein zeigt eine konstante Aktivität und wird bei der Erhöhung der externen Osmolalität nicht stimuliert (Ott, 2008). Somit ist die räumliche Orientierung der C-Domäne bei der Proteinaktivierung bisher nicht im Detail verstanden.

Einleitung

Obwohl die Erhöhung der intrazellulären Kaliumkonzentration eine bedeutende Rolle bei der BetP-Aktivierung unter hyperosmotischen Bedingungen spielt, ist sie nicht der einzige Parameter, der BetP stimulieren kann. Es wurde nachgewiesen, dass BetP bei K^+ -verarmten *C. glutamicum*-Zellen, deren interne Kaliumkonzentration ca. 20 mM beträgt, bei niedrigosmotischen Bedingungen (0,24 osmol/kg) in Gegenwart von 2,5 mM KCl extern aktiviert werden kann. Die Steigung der Betainimportrate korrelierte in diesen Zellen mit der Zunahme der internen Kaliumkonzentration. Wurden die Zellen aus dieser Kultur mit KCl supplementiert und zusätzlich einer hohen externen Osmolarität (1,2 osmol/kg) ausgesetzt, zeigten sie eine ca. 4,5-fach höhere BetP-Aktivität als bei K^+ -Stimulierung allein. Anhand dieser Daten wurde vorgeschlagen, dass Kalium notwendig, aber nicht hinreichend für die BetP-Stimulierung ist (Ott, 2008). Daher stellte sich die Frage über die Natur des zweiten, Kalium-unabhängigen Stimulus zur Aktivierung von BetP.

Ausgiebige Untersuchungen zur Aktivitätsregulation von BetP in *E. coli*-Lipidvesikeln konnten bereits in der Vergangenheit die Komplexität des zellulären Systems reduzieren und somit die putativen Stimuli eingrenzen. Zu den Parametern, die in BetP-Proteoliposomen bislang noch nicht genauer untersucht wurden, zählen zum einen das *molecular crowding* sowie die physikalischen Parameter der Membran (z.B. der laterale Membrandruck). *Macromolecular crowding* spielt eine Rolle bei der Regulation des Osmosensors ProP. Das Protein konnte in Proteoliposomen unter anderem durch Polyethylenglykole unterschiedlicher Länge aktiviert werden (Culham *et al.*, 2003; Racher *et al.*, 2001). Daher wurde vorgeschlagen, dass ProP die Veränderung seines Hydratationsstatus wahrnehmen kann (Wood, 2006). Der Einfluss der Veränderung des Hydratationsstatus von BetP sowie der Erhöhung der Ionenstärke des Cytoplasmas auf die BetP-Aktivierung bei hyperosmotischen Bedingungen wurde jedoch ausgeschlossen, weil viele organische Osmolyte wie Prolin, Ectoin, Carnitin und Glucose sowie anorganische Ionen wie Na^+ und Cl^- keine aktivierende Wirkung auf BetP hatten (Rübenhagen, 2001). Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass die BetP-Regulation von der Lipidzusammensetzung der Plasmamembran und ihrem physikalischen Zustand beeinflusst werden kann.

In diesem Zusammenhang wurde nachgewiesen, dass BetP-Aktivität in *C. glutamicum*-Zellen durch die Zugabe von Tetracain stimuliert werden kann (Peter *et al.*, 1998; Rübenhagen, 2001; Steger, 2002). Das Lokalanästhetikum Tetracain ist eine amphipathische Verbindung, die den physikalischen Zustand einer Lipidmembran beeinflusst (Auger *et al.*, 1988). Die

Einleitung

Veränderung des lateralen Membrandrucks dient z.B. bei den bereits erwähnten mechanosensitiven Kanälen als Aktivierungsstimulus. Diese Transmembranproteine, die im direkten Kontakt mit der Membran stehen, registrieren die Spannungsänderungen der Phospholipiddoppelschicht und öffnen sich bei einer bestimmten Zugstärke (Booth *et al.*, 2007; Sukharev *et al.*, 1994). Anhand der Untersuchungen zur Kältestimulierung von BetP wurde vorgeschlagen, dass die Lipidzusammensetzung der Membran wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der BetP-Aktivierung durch den Kälte- bzw. Osmostress spielt (Henrich, 2008; Özcan *et al.*, 2007). BetP ist nicht nur ein Osmosensor und Osmoregulator, der Transporter wird außerdem bei niedrigen Temperaturen aktiviert (Özcan *et al.*, 2007, 2005). Bei niedrigen externen Osmolalitäten erreicht die BetP-Aktivität bei 10-15°C den maximalen Wert und nimmt bei einem weiteren Temperaturanstieg ab. Die Erhöhung der intrazellulären Kaliumkonzentration spielt bei der Kältestimulierung keine Rolle, da K⁺ bei Kältestress nicht akkumuliert wird (Özcan *et al.*, 2005). Außerdem wies BetP Δ C25 mit einer um 25 Aminosäuren verkürzten C-Domäne Kältestimulierung auf, während die osmotisch-bedingte Aktivierung bei dieser BetP-Mutante verloren ging (Özcan, 2006). Folglich sind verschiedene Stimuli bei Kältestress und bei hyperosmotischem Stress für die Aktivierung von BetP verantwortlich.

Die Regulation der BetP-Aktivität bei Kältestress änderte sich in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur. Wurden die Zellen bei 12 °C kultiviert, war das Aktivitätsoptimum von BetP bei niedrigen Temperaturen nicht mehr zu beobachten. Außerdem korrelierte die Verringerung der BetP-Sensitivität gegenüber hyperosmotischem Stress mit der Abnahme der Kultivierungstemperatur. (Özcan *et al.*, 2007). Bei der Untersuchung der Plasmamembran von *C. glutamicum* nach unterschiedlicher Wachstumstemperatur wurden signifikante Unterschiede der Lipidzusammensetzung festgestellt. Die Plasmamembran von *C. glutamicum* besteht zu etwa 95 % aus den Phospholipiden mit sauren Kopfgruppen Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylinositol (PI) und Cardiolipin (CL). Ölsäure (18:1) und Palmitinsäure (16:0) machen ca. 95 % der gesamten Fettsäuren aus. Die Gesamtanteile der oben genannten Kopfgruppen und Fettsäuren bleiben zwar bei den Kultivierungstemperaturen von 12 - 40 °C gleich, ihre individuellen Anteile ändern sich jedoch. Bei Kultivierungstemperaturen von 30°C bis 40°C liegen Oleoyl- und Palmitoylreste in der Plasmamembran in einem Verhältnis von ca. 1:1 vor. Bei niedrigeren Wachstumstemperaturen steigt der Anteil der ungesättigten Oleoylreste annähernd linear an, wohingegen der Gehalt der gesättigten Palmitoylreste abnimmt. Bei 12 °C beträgt das

Einleitung

Verhältnis von Oleoylresten zu Palmitoylresten ca. 7:3. Die Erhöhung des Anteils der ungesättigten Fettsäurereste in der Membran bei niedrigeren Temperaturen dient dem Aufrechterhalten der Membranfluidität. Die Anteile der Phospholipidkopfgruppen in der Membran von *C. glutamicum* verändern sich ebenfalls in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur. Bei niedrigeren Kultivierungstemperaturen war der PG-Anteil erhöht, während bei höheren Temperaturen das Anhäufen von PI- und CL-Spezies beobachtet wurde (Özcan *et al.*, 2007).

Somit wurde vermutet, dass die Veränderung der Lipidzusammensetzung der Membran die BetP-Regulation beeinflussen könnte. Die Protein-Lipid-Interaktionen könnten der Grund der kältebedingten BetP-Aktivierung sein und möglicherweise auch die Osmostimulierung von BetP beeinflussen (Özcan *et al.*, 2007). Es blieb jedoch die wichtige Frage offen, ob die Zusammensetzung der Kopfgruppen oder die der Fettsäuren die BetP-Regulation beeinflussen. Die *in vivo*-Untersuchung der Auswirkung unterschiedlicher Phospholipidkopfgruppen auf die BetP-Regulation erfolgte in *C. glutamicum* DHPF Δ *cls* und *C. glutamicum* DHPF::*pgsA*. Die erste Mutante hat einen Defekt im Cardiolipinsyntheseweg, während die letztere kein Phosphatidylinositol bilden kann. Die Änderung der Kopfgruppenzusammensetzung hatte jedoch keine detektierbare Auswirkung auf die BetP-Aktivierung sowohl bei Kältestress als auch bei hyperosmotischen Bedingungen. Somit beeinflusst die Fettsäurezusammensetzung und nicht die Kopfgruppenkomposition der Membran die BetP-Regulation (Henrich, 2008). Die mechanistische Grundlage des Einflusses der Fettsäuren auf die BetP-Regulation ist allerdings bisher nicht verstanden.

Die in diesem Kapitel dargestellten Daten demonstrieren, dass BetP ein komplexes Protein ist, das die Eigenschaften eines Transporters, eines Sensors und eines Regulators vereint. Es reagiert auf die Veränderung der externen Osmolalität in Zellen und in Proteoliposomen und passt seine Aktivität daran an. BetP kann verschiedene Stimuli unterschiedlicher Natur wahrnehmen. Die Erhöhung der internen K⁺-Konzentration wurde als ein BetP-Stimulus in Proteoliposomen nachgewiesen. In Zellen ist BetP in der Lage, mindestens einen weiteren, K⁺-unabhängigen Stimulus zu perzipieren, der wahrscheinlich mit dem physikalischen Zustand der Membran assoziiert ist.

1.5 Ziele der Arbeit

Die Regulation von BetP wurde seit mehreren Jahren ausführlich untersucht. Besonders in Proteoliposomen wurde die Auswirkung unterschiedlicher Parameter, die sich bei hyperosmotischem Schock ändern können, auf die Regulation des Transporters studiert. Der einzige Parameter, der zur Stimulation von BetP in Vesikeln führte, war die Erhöhung der internen K^+ -Konzentration. Es gibt auch Hinweise darauf, dass K^+ bei der BetP-Aktivierung in intakten Zellen eine wichtige Rolle spielt. In Zellen ist BetP in der Lage, mindestens einen weiteren, K^+ -unabhängigen Stimulus zu perzipieren, der wahrscheinlich mit dem physikalischen Zustand der Membran assoziiert ist. Allerdings war die Analyse der BetP-Aktivierung *in vivo* für eine lange Zeit eingeschränkt, weil der intrazelluläre K^+ -Gehalt nicht effektiv beeinflusst werden konnte. Die intensiven Studien der K^+ -Homöostase im Ursprungsorganismus von BetP, *C. glutamicum*, lieferten Erkenntnisse, welche die Kontrolle der zytoplasmatischen K^+ -Konzentration in diesem Bakterium ermöglichten. Das Ziel dieser Arbeit war die nähere Differenzierung unterschiedlicher BetP-Stimuli in intakten Zellen, die ein tieferes Verständnis der BetP-Aktivierung *in vivo* liefern sollten. Im Fokus dieser Arbeit steht damit die Charakterisierung der Natur des K^+ -unabhängigen BetP-Stimulus. Es sollte außerdem geklärt werden, warum der K^+ -unabhängige Stimulus nur in Zellen und nicht in Proteoliposomen nachgewiesen wurde.

2. Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und ihre Genotypen sind in Tabelle 2.1 dargestellt. Die verwendeten Plasmide und ihre Eigenschaften sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Tabelle 2.1: Für die Arbeit verwendete Bakterienstämme und ihre Genotypen

E.coli

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 α mcr	<i>endA1 supE44 thi-1 λ-recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF) U196 ϵ80DlacZ ΔM15mcrA Δ(mmr hsdRMS mcrBC)</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
MKH13	<i>araD39 (argF-lac) U169 relA51 rps150 flbB5301 deoC ptsF25 Δ(putPA)101 V(proP)2 Δ(proU)</i>	Haardt <i>et al.</i> , 1995

C.glutamicum

Stamm	Genotyp	Referenz
DHPF	ATCC13032 Δ betP, Δ ectP, Δ lcoP, Δ proP, Δ putP	Steger <i>et al.</i> , 2004
Δ cglK/ Δ kup	ATCC 13032 mit Deletion der Gene <i>cgl0777</i> und <i>cgl0712</i>	Becker, 2007

Tabelle 2.2 : Für die Arbeit verwendeten Plasmide und ihre Eigenschaften

Plasmid	Resistenz	Eigenschaften	Referenz
pXMJ19betP C252T	Cam ^R	pXMJ19 mit betPC252T	Schiller <i>et al.</i> , 2004
pXMJ19betP C252T Δ C25	Cam ^R	pXMJ19 mit betPC252T Δ C25	diese Arbeit
pXMJ19betP C252T Δ C45	Cam ^R	pXMJ19 mit betPC252T Δ C45	Ott, 2008
pASK-IBA5 betP C252T	Karb ^R	pASK-IBA5 mit betP C252T in der BsaI/HindIII Schnittstelle; N-terminaler StrepII-Tag	Rübenhagen <i>et al.</i> , 2000

2.2 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

2.2.1 Nährmedien für *E. coli*

E. coli wurde im Vollmedium Luria Bertani (LB) kultiviert. Für die Herstellung des Festmediums wurden dem Medium zusätzlich 16 g/l Agar zugesetzt. Für die Herstellung transformationskompetenter Zellen und für die Transformation der Zellen wurden die Vollmedien SOB und SOC verwendet.

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

- 10 g/l Bacto-Trypton
- 5 g/l Bacto-Yeast Extract
- 10 g/l NaCl

SOB-Medium (Hanahan, 1985)

- 2 g/l Bacto Trypton
- 5 g/l Bacto Yeast Extract
- 10 mM NaCl,
- 2,5 mM KCl,
- 10 mM MgSO₄,
- 10 mM MgCl₂
- H₂O_{dd} auf 1l

SOC-Medium (Hanahan, 1985)

- SOB mit 20 mM Glucose

2.2.2 Nährmedien für *C. glutamicum*

C. glutamicum ATCC 13032 und *C. glutamicum* DHPF wurden in BHI-Vollmedium kultiviert. Für die Herstellung von Festmedien wurden den oben genannten Medien 16 g/l Agar zugesetzt. Für die Kultivierung von *C. glutamicum* Δ *cgk*/ Δ *kup* wurde BHI mit 150 mM KCl verwendet.

Material und Methoden

BHI-Medium (Difco Laboratories, Detroit, USA)

- 37 g/l Difco Brain Heart Infusion

BHIS-Medium

- BHI-Medium mit 0,5 M Sorbit

Zusätzlich wurde das Minimalmedium MMI verwendet (Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: Zusammensetzung des Minimalmediums MMI

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

Die Stammlösung wurde in vierfacher Konzentration angesetzt. Die Spurenelementlösung, sowie Glucose, Biotin, CaCl₂ und MgSO₄ wurden jeweils separat in höheren Konzentrationen angesetzt und unmittelbar vor der Kultivierung dem Nährmedium zugegeben. Für die K⁺-freie Kultivierung von *C. glutamicum* wurde Kaliumphosphat in der Stammlösung durch Natriumphosphat ersetzt.

2.2.3 Medienzusätze

Zur Selektion rekombinanter *E. coli* (pASK-IBA5)-Stämme, wurde Carbenicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml dem Kulturmedium zugegeben. Nach der Transformation von *C. glutamicum* mit dem Plasmid pXMJ19 erfolgte die Selektion rekombinanter Stämme durch die Zugabe von Chloramphenicol (25 µg/ml) ins Kulturmedium. Für die Induktion der Transkription von *betP*, das im Plasmid pXMJ19 unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren Promoters steht, wurde dem Medium IPTG (50 µM) zugesetzt. Die Induktion der Transkription von *betP*, das im Plasmid pASK-IBA unter Kontrolle des Tetrazyklin-induzierbaren Promoters steht, wurde dem Medium AHT (200 µM) zugesetzt.

2.2.4 Kultivierungsbedingungen der Bakterien

Die Anzucht der Bakterienkulturen erfolgte bei aeroben Bedingungen bei 125 Umdrehungen pro Minute. Die Vorkulturen wurden in Reagenzgläsern oder Kolben mit seitlichen Schikanen angezogen. Die Kultivierungstemperatur betrug 37°C für *E. coli*-Kulturen und 30°C für *C. glutamicum*-Kulturen. Die optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) wurde mit Hilfe des Spektrophotometers Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotec) bestimmt. Eine OD₆₀₀ von 1 entspricht einer Zelldichte von etwa 10⁹/ml (Miller, 1992).

Zur Lagerung der Bakterienstämme wurden Glycerindauerkulturen verwendet. Dazu wurden 600 µl Bakterienkultur, die über Nacht kultiviert wurde, mit 400 µl 86 %-igem Glycerin zusammengeführt und bei -80°C aufbewahrt. Zur Lagerung von *E. coli*-Kulturen wurden außerdem Roti[®]-Store (Carl Roth) Kryoröhrchen verwendet.

2.3 Molekularbiologische Techniken

2.3.1 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*

Transformationskompetente Zellen des *E. coli*-Stammes DH5αmcr wurden nach der Methode von Inoue *et al.* (Inoue *et al.*, 1990) hergestellt und transformiert. Dafür wurden *E. coli* DH5αmcr in 20 ml LB-Medium über Tag kultiviert. Daraufhin wurde mit 1 ml dieser Kultur

Material und Methoden

250 ml SOB-Medium angeimpft und über Nacht bei Raumtemperatur und 200 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden 10 min bei 2000 g und 4°C zentrifugiert, mit 4°C-kaltem TB-Puffer gewaschen und in 20 ml TB-Puffer (4°C) resuspendiert. 1,4 ml DMSO wurden tropfenweise hinzugegeben. Anschließend wurden die kompetenten Zellen aliquotiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

TB-Puffer

- 10 mM Pipes (pH 6,7)
- 250 mM KCl
- 55 mM MnCl₂
- 15 mM CaCl₂

2.3.2 Herstellung transformationskompetenter *C. glutamicum*

Zur Transformation von *C. glutamicum* wurde die Methode der Elektroporation verwendet (Tauch *et al.*, 2002). Dazu wurden 50 ml BHIS-Medium mit *C. glutamicum* von einer Agarplatte angeimpft und 24 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 5 ml der Vorkultur in 250 ml BHIS-Medium überimpft (in 2 l-Kolben mit seitlichen Schikanen) und bis zu einer OD₆₀₀ von 2 inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (2000 g, 9 min, 4 °C). Die Zellen wurden danach dreimal mit 20 ml eiskaltem TG-Puffer und weitere zweimal mit 50 ml eiskaltem 10 %-igem (v/v) Glycerin gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1,5 ml eiskaltem 10 %-igem (v/v) Glycerin resuspendiert, in Aliquots von 150 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

TG-Puffer

- 1 mM Tris/Cl (pH 7,5)
- 10 % Glycerin

2.3.3 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation wurden 100 µl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, 1 µl des Plasmids zugegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend erhielten die Zellen für 30 sec einen Hitzeschock (42°C), bevor sie wieder auf Eis überführt wurden. Zu dem Ansatz wurden 800 µl SOC-Medium zugegeben und die Kultur wurde für 1 h bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden zentrifugiert, in 100 µl des Überstandes resuspendiert, auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3.4 Transformation von *C. glutamicum*

Zur Transformation wurden 50µl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, 1 µl des Plasmids dazugegeben und gut gemischt. Anschließend wurden die Zellen in eine eiskalte Elektroporationsküvette überführt und durch Elektroporation (2,5kV, 600Ω, 2,5µF) mit einem MICRO PULSER™ (Bio-Rad) mit den Plasmiden transformiert. Daraufhin wurde zu dem Ansatz 1ml BHIS-Medium gegeben und die Kultur für 1 h bei 30°C geschüttelt. Die Zellen wurden zentrifugiert (2000 g, 9 min, 30°C), in 100µl des Überstandes resuspendiert, auf BHI-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über 1-2 Tage bei 30°C inkubiert.

2.4 Allgemeine analytische Methoden

2.4.1 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde das Amido-Schwarz-Verfahren (Schaffner und Weissmann, 1973) verwendet, da es eine geringe Störanfälligkeit gegen enthaltene Lipide und Detergenzien hat. Zur Erstellung der Kalibrierungsreihe wurde BSA eingesetzt.

2.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Membranproteine von *E.coli* und *C. glutamicum* wurden nach der Membranpräparation bzw. der Reinigung in 12,5 %-igen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970) mittels Elektrophorese getrennt. Die Proteinlösungen wurden vor dem Auftrag auf das Gel mit vierfach konzentriertem SDS-Probenpuffer zusammengeführt. Der direkte Nachweis der Proteine in den Gelen erfolgte mittels Coomassie Brilliant Blau Färbung (Sambrook *et al.*, 1989).

SDS-Probenpuffer (x4)

- 20 % Glycerin
- 4 % SDS
- 400 mM Tris/Cl (pH 6,8)
- 10 mM EDTA
- 100 μ M β -Mercaptoethanol
- Bromphenolblau

2.4.3 Immunologischer Nachweis von BetP

2.4.3.1 Western Blot

Die Proteinproben wurden mittels einer 12,5 %-SDS-PAGE getrennt. Die Übertragung der Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran wurde mit dem *semi-dry*-Blotverfahren (Kyhse-Andersen, 1984) durchgeführt. Da alle in dieser Arbeit verwendeten BetP-Varianten einen N-terminalen StrepII-Tag enthielten, erfolgte der immunologische Nachweis von BetP mit monoklonalen anti-StrepII-Antikörpern nach der Methode von Towbin (Towbin *et al.*, 1979). Nach der Proteinübertragung wurde die PVDF-Membran zunächst 1 h in Blockierungspuffer bei Raumtemperatur geschüttelt und dann eine weitere Stunde im gleichen Puffer mit dem Primärantikörper (Maus, Strep-MAB Classic, Iba) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS (jeweils 5 min) wurde die Membran für 1 h mit dem sekundären Antikörper (Ziege, anti-Maus mit alkalische Phosphatase-Konjugat (Sigma-Aldrich); 1:10000 verdünnt) in Blockierungspuffer bei

Material und Methoden

Raumtemperatur geschüttelt. Der Farbnachweis erfolgte durch die Reaktion von BCIP und NBT, die durch die alkalischen Phosphatase katalysiert wird (McGadey, 1970). Die Farbreaktion wurde durch mehrfaches Waschen mit H₂O gestoppt. Zuletzt wurde die Membran an der Luft getrocknet.

2.4.3.2 Dot Blot und BetP-Quantifizierung

Um BetP in Zellextrakten quantitativ nachzuweisen, wurde das Dot Blot-Verfahren verwendet. Die Zellen wurden mit dem Aufschlusspuffer bei 4°C gewaschen und im selben Puffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte bei 4°C mit Hilfe von Glasperlen (Ø: ~0,2 mm) im Zellhomogenisator „Precellys 24“ (Bertin Technologies). Es wurden vier Aufschlussgänge je 45 s bei 6500 Upm durchgeführt. Das Zellhomogenisat wurde mit 0,5 % Lauroylsarcosin (LS) versetzt, gemischt und 1 min bei 40 °C im Thermoblockschüttler inkubiert. Anschließend wurde das Solubilisat 30 s bei 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine trockene Nitrocellulosemembran aufgetragen. Für die Kalibrierung wurde gereinigtes BetP verwendet, das mit gleichen Zellhomogenisatmengen, wie in Überexpressionsproben, vermischt wurde. Allerdings stammte das Zellhomogenisat für die Kalibrierungsproben von Bakterienstämmen, die kein *betP* enthalten.

Nach der Probenauftragung wurde die NC-Membran für 15 min an der Luft getrocknet und anschließend im Blockierungspuffer überführt. Die darauffolgenden Inkubationsschritte mit den Antikörpern und BCIP/NBT erfolgten wie beim Western Blot (s. letzten Abschnitt). Nach der Färbung der Proben wurde die NC-Membran viermal mit PBS gewaschen um die Reaktion abzustoppen. Die gefärbten Membranfragmente wurden ausgeschnitten und in Reaktionsgefäße (2 ml) überführt.

Um BetP in den Proben zu quantifizieren, wurde para-Nitrophenylphosphat (p-NPP) verwendet. Die alkalische Phosphatase, katalysiert die Umsetzung vom p-NPP zu para-Nitrophenol (p-NP), das ein Absorptionsmaximum im Bereich von 400-410 nm hat. Beide Substrate sind wasserlöslich, daher wurde p-NP durch die Messung der Absorption bei 406 nm (A_{406}) in der Lösung detektiert. Die pNPP-Arbeitslösung wurde in die Reaktionsgefäße mit Membranfragmenten zugegeben und 3-5 h bei Raumtemperatur im Rotationsschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 406 (A_{406}) nm in der Lösung gemessen. Die A_{406} -Werte der Kalibrierungsproben wurde gegen die BetP-Masse

Material und Methoden

aufgetragen, die Regressionsgerade wurde erstellt. Die BetP-Konzentration in den Proben wurde mithilfe der Formel der Kalibrierungsgerade berechnet.

Aufschlusspuffer

- 25 mM NaPi (pH 8)
- 0,1 M NaCl

Transferpuffer

- 10 mM CAPS (pH 11)
- 1,5 M NaCl
- 10% Methanol

TBS (TRIS buffered saline)

- 50 mM Tris (pH 7,5)
- 0,9 % NaCl

Blockierungspuffer

- TBS mit 3 % Magermilchpulver

NBT-Stammlösung

- 0,5 g p-Nitrotetrazoliumblausäurechlorid (NBT)
- 10 ml 70% Dimethylformamid

In 0,5 ml Aliquots bei -20°C lagern

BCIP-Stammlösung

- 0,5 g 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz (BCIP)
- 10 ml 100% Dimethylformamid

Material und Methoden

In 0,5 ml Aliquots bei -20°C lichtgeschützt lagern.

Inkubationspuffer für alkalische Phosphatase

- 0,1 M NaCl
- 5 mM MgCl₂
- 0,1 M Tris (pH 9,5)

pNPP-Arbeitslösung

- 1 g/l para-Nitrophenylphosphat (pNPP)
- 10 mM Diethanolamin (pH 9,5)
- 0,5 mM MgCl₂

2.4.5 Bestimmung der Osmolalität

Die Osmolalität von Puffern wurde mit Hilfe eines Osmometers (Osmomat 030, Gonotec) bestimmt. Als Standard wurden Kalibrierungslösungen mit 100, 200, 500 und 1200 mosm/kg verwendet.

2.4.6 Bestimmung der intrazellulären K⁺-Konzentrationen in *C. glutamicum*

Die intrazellulären K⁺-Konzentrationen wurde mittels Atomemissionsspektroskopie (AES) bestimmt. Es wurde das Flammenphotometer ELEX 6361 (Eppendorf) verwendet. Zur Kalibrierung wurden wässrige KCl-Lösungen mit Konzentrationen von 50-300 µM verwendet. Die Messungen erfolgten ohne Verwendung eines Leitlinienelements bei Verstärkung des Kaliumsignals (K⁺-Kennzahl Verst. 5,997). Wurde die K⁺-Konzentration von 300 µM überschritten, wurden die Proben mit H₂O_{dd} verdünnt und erneut vermessen.

Für die Bestimmung der intrazellulären K⁺-Konzentration wurde *C. glutamicum* wie folgt kultiviert und präpariert. Eine 10 ml-Flüssigkultur wurde in BHI-Medium und über Tag (ca. 8 h) inkubiert. Mit dieser Kultur wurde anschließend eine 25 ml Kultur mit LB-Medium auf eine Start-OD₆₀₀ von ~0,1 angeimpft, mit 50 µM IPTG versetzt und über Nacht ca. 17 h

Material und Methoden

inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zentrifugiert (2000 g, 5 min, 4°C) und zweimal mit 20 ml Basispuffer gewaschen und in diesem resuspendiert, so dass eine OD₆₀₀ von 2-4 eingestellt wurde. Die Zellen wurden mit 20 mM Glukose energetisiert und bis zur Messung auf Eis gelagert.

Die Bakterien wurden für 10 min bei 30 °C in Basispuffer (0,1 M NaCl, 25 mM NaPi pH 8) bei unterschiedlicher externen KCl-Konzentration und gegebenenfalls bei hoher externen Osmolalität (1 osmol/kg) inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension 30 s lang bei 20000 g zentrifugiert und der Überstand wurde abgesaugt. Die sedimentierten Zellen wurden in H₂O_{dd} resuspendiert und 45 min bei 80 °C im Ultraschallbad (Sonorex Super Plus 10P Digital, Bandelin electronic) bei höchster Leistung inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (20000 g, 30 min) entfernt und die K⁺-Konzentration im Überstand gemessen. Für die Berechnung der intrazellulären K⁺-Konzentration muss das interne Zellvolumen der Bakterien bekannt sein. Da Letzteres in dieser Arbeit nicht bestimmt wurde, wurden die Daten aus einer früheren Arbeit verwendet, in der die Zellen bei ähnlichen Bedingungen kultiviert wurden (Botzenhard, 2004). Bei Zellen, die der externen Osmolalität von 0,24 bzw. 1 osmol/kg ausgesetzt wurden, betrug der Innenvolumenumrechnungsfaktor 1,6 bzw. 1,4 µl/mg ZTM.

2.4.7 Messung der Proteoliposomengröße mittels dynamischer Lichtstreuung

Mithilfe der dynamischen Lichtstreuung (DLS) kann die Größenverteilung der Partikeln in einer Lösung untersucht werden. Die Proteoliposomen wurden nach dem 17-fachen Extrudieren durch die Polycarbonatmembran (Porengröße: 0,4 µm) vermessen. Als Puffer wurde standardgemäß 0,1 M KPi-Puffer (pH 7,5) verwendet. Dieser wurde durch eine Membran mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert. Die Messung und die Auswertung erfolgten mithilfe des Moduls DynaPro-99 Dynamic Light Scattering (Protein Solutions) sowie der Software Dynamics V6 (Biostad). Für jede Probe wurden mindestens 25 Messungen (einmal pro 10 s) durchgeführt. Die Messtemperatur betrug 20 °C, die Laserwellenlänge 657,9 nm, als Model für die Berechnung des Radius wurde „*Globular Proteins*“ gewählt. Die SOS-Werte lagen bei <10.

0,1 M KPi-Puffer

- 0,1 M K_2HPO_4 mit 0,1 M KH_2PO_4 auf bis zum gewünschten pH-Wert titrieren

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Membranpräparation

Die Kultivierung von *E. coli* DH5*amcr* (pASK-IBA5 betP C252T) wurde wie folgt durchgeführt. Ein Einzelklon wurde verwendet, um 5 ml LB-Medium (50 µg/ml Carbenicillin) anzupflanzen. Diese Kultur wurde 8-9 Stunden bei 37°C und 125 Upm inkubiert. Anschließend wurden mit dieser Vorkultur zwei 100 ml Kulturen auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft und über Nacht kultiviert. Am nächsten Morgen wurden Expressionskulturen mit der Übernachtskultur in Verhältnis 30:1 angeimpft. Nach dem Erreichen einer OD_{600} von 0,7-0,9 wurde die *betP*-Transkription mit AHT (IBA) in einer Endkonzentration von 200 µg/l induziert und die Kultur wurde für weitere 3 Stunden inkubiert.

Die Präparation der Membranen von *E. coli* und *C. glutamicum* erfolgte bei 4°C. Die Zellen wurden zunächst geerntet und mit 0,1 M KPi-Puffer (pH 7,5) gewaschen, bevor sie in 0,1 M KPi (pH 7,5) mit DNase (2 µg/ml) und dem Proteaseinhibitor Complete® (Roche) nach Herstellerangaben resuspendiert wurden. Die Zellen wurden mit Hilfe einer „French Press“ (SLM Aminco®) in 3-4 Durchgängen bei einem Druck von 1200 psi aufgeschlossen. Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurden die Membranen bei 300000 g für 1 h sedimentiert, mit dem oben aufgeführten Puffer gewaschen, anschließend in 1-2 ml Puffer pro Liter eingesetzter Zellkultur resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.5.2 Isolierung von Strep-BetP C252T

Zur Isolierung von BetP C252T wurde das Strep-tag®II-Peptid (NH₂-WSHPQFEK-COOH; IBA; (Schmidt *et al.*, 1996)) an den N-Terminus des Proteins fusioniert. Der Strep-tag®II bindet mit hoher Spezifität an StrepTactin® (Voss und Skerra, 1997) und kann mit Desthiobiotin eluiert werden. Die Proteinisolierung erfolgte bei 4°C. Zur Solubilisierung der präparierten Membranen wurden die Membransuspensionen 1:2 mit 17,2 % Glycerin mit 2

Material und Methoden

mM EDTA verdünnt, so dass eine Endkonzentration von 50 mM KP_i (pH 7,5), 8,6 % Glycerin, 1 mM EDTA eingestellt wurde. Daraufhin wurde das nichtionische Detergenz Dodecylmaltosid unter Rühren tropfenweise bis zu einer Endkonzentration von 2% (v/v) hinzugegeben. Das Solubilisat wurde 45-60 min bei 4°C unter Rühren inkubiert, wonach es bei 86.900 g für 20 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde mit Puffer A vierfach verdünnt, um die Detergenzkonzentration herabzusetzen.

Die BetP-Isolierung wurde mit Hilfe der FPLC-Anlage ÄKTAPurifier™ (GE Healthcare) isoliert. Die Durchflussrate betrug 1 ml/min. Das Säulenmaterial - StrepTactin®-Sephrose (GE Healthcare) - wurde mit 10 Säulenvolumina Puffer A mit 0,1% Dodecylmaltosid äquilibriert. Das verdünnte Solubilisat wurde auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 10 Säulenvolumina Puffer B und danach mit 3 Säulenvolumina Puffer A gewaschen. Das gebundene BetP wurde mit 4 Säulenvolumina Puffer E von der Säule eluiert.

Puffer A

- 50 mM KP_i (pH 8,0)
- 0,2 M NaCl
- 8,6 % Glycerin
- 1 mM EDTA

Puffer B

- 50 mM KP_i (pH 8,0)
- 0,5 M NaCl
- 8,6 % Glycerin
- 1 mM EDTA

Puffer E

- Puffer A mit 5 mM Desthiobiotin (IBA)

2.5.3 Herstellung von Liposomen

Zur Herstellung von Liposomen wurde *E. coli polar total lipid extract* (Avanti Polar Lipids, Inc.), die synthetischen Phospholipide DOPG (1,2-Dioleoyl-sn-Glycerol-3-Phosphat) und POPG (1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycerol-3-Phosphat) 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 0,1 M KPi-Puffer (pH 7,5) mit 2 mM β -Mercaptoethanol unter starkem Rühren resuspendiert, so dass die Endkonzentration von Lipiden 20 mg/ml betrug. Die Lipidsuspensionen wurden in 1 ml Aliquots aufgeteilt, mit gasförmigem Stickstoff überschichtet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.5.4 Rekonstitution von Strep-BetP C252T in Liposomen

Der Einbau von Strep-BetP in Liposomen wurde nach der Methode von Rigaud *et al.* (Rigaud *et al.*, 1995) durchgeführt. Standardgemäß wurde für die Rekonstitution von BetP polares Lipidextrakt aus *E. coli* (Avanti) verwendet. Die *E. coli*-Liposomen wurden in 0,1 M KPi (pH 7,5) auf eine Konzentration von 5 mg/ml verdünnt und 17-mal durch die Polycarbonatmembran mit der Porengröße von 0,4 μ m (Nuclepore Track-Etch Membrane, Whatman) extrudiert. Es wurde der Avanti Mini-Extruder (Avanti) verwendet. Die extrudierten Liposomen wurden durch Zugabe von Triton X-100 bis kurz über den Punkt der Detergenzsättigung titriert. Die Insertion des Detergenz in die Liposomen wurde durch Trübungsmessung bei 540 nm verfolgt. Anschließend wurde gereinigtes BetP im Protein/Lipid-Verhältnis (PLV) von 1:30 (w/w) tropfenweise unter rühren zugegeben und die Suspension unter leichtem Schütteln für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um das überschüssige Detergenz zu entfernen, wurde der Ansatz mit x mg Polystyrolkugeln „Biobeads“ (Biorad) für 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurden noch x μ g Biobeads zugegeben und nach weiteren zwei Stunden noch $2x$ mg Biobeads, wonach der Ansatz über Nacht bei 4°C geschüttelt wurde. Am nächsten Morgen erfolgte die Zugabe weiterer x μ g Biobeads und die Inkubation für 1 h bei 4°C unter Schütteln. Nach Abtrennung der Biobeads wurden die Proteoliposomen zentrifugiert (~350.000 g, 20 min, 4°C), zweimal mit 0,1 M KPi pH 7,5 gewaschen und im gleichen Puffer resuspendiert (Enkonzentration: ca. 60 mg Lipid/ml). Die Vesikeln wurden in kleine Aliquots (50-100 μ l) aufgeteilt, in flüssigem

Material und Methoden

Stickstoff schockgefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut (Frieren/Tauen-Zyklus). Nach einem zusätzlichen Frieren/Tauen-Zyklus wurden die Proteoliposomen wieder eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Vor einer Betainimportmessung wurden die Vesikeln durch die Polycarbonatmembran extrudiert, sedimentiert und im frischen Puffer resuspendiert, so dass die End-Lipidkonzentration ca. 60 mg/ml betrug. Für das Extrudieren soll das Volumen der Proteoliposomensuspension 500 μl nicht unterschreiten, deshalb musste die Suspension gegebenenfalls mit 0,1 M KPi (pH 7,5) auf mind. 500 μl aufgefüllt werden.

Berechnung der Nassmasse von Biobeads

$$x = (\text{eingesetzte } \mu\text{l Triton X-100} * 5) + \text{eingesetzte } \mu\text{g Dodecylmaltosid} * 10$$

2.5.5 Variation der Lipid- oder Pufferzusammensetzung der Proteoliposomen

Zur Variation der Lipidzusammensetzung durch Liposomenfusion wurden Proteoliposomen aus *E. coli*-Phospholipiden mit Liposomen aus synthetischen Phospholipiden in gewünschten Verhältnissen gemischt. Um das PLV in Proteoliposomen zu variieren, wurden statt synthetischer Lipide polare *E. coli*-Lipide zu den BetP-Proteoliposomen zugegeben. Das Gesamtvolumen wurde jeweils mit 0,1 M KPi auf ca. 0,7 ml eingestellt. Die Proteoliposomensuspension wurde durch die Polycarbonatmembran extrudiert (Porengröße: 0,4 μm). Anschließend wurde das Volumen der Vesikelsuspension auf ca. 1 ml eingestellt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bei Raumtemperatur aufgetaut und gründlich gemischt. Der Frieren/Tauen-Zyklus wurde dreimal durchgeführt. Vor der Betainimportmessung wurden die Vesikeln extrudiert und ankonzentriert.

Um den Puffer in Proteoliposomen auszutauschen wurden die letzteren zuerst durch die Ultrazentrifugation sedimentiert (20 min, ~ 350000 g, 20°C) und der Überstand verworfen. Die Vesikel wurden in 1 ml neuem Puffer resuspendiert. Nach einem Frieren/Tauen-Zyklus wurden die Vesikel durch die Polycarbonatmembran (Porengröße: 0,4 μm) extrudiert. Darauf folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt, der Überstand wurde verworfen und die Vesikeln wurden wieder in 1 ml Puffer resuspendiert. Darauf folgte ein weiterer Frieren/Tauen-Zyklus. Vor der Betainimportmessung wurden die Vesikeln extrudiert und ankonzentriert.

2.5.6 Bestimmung der Phospholipidkonzentration

Die Bestimmung der Phospholipidkonzentration erfolgte durch die Quantifizierung des Phosphats mittels der Phosphatveraschung. Die phospholipidhaltigen Proben (50 µl) wurden getrocknet, mit 0,3 ml Perchlorsäure versetzt 1 h bei 180°C inkubiert. Die Proben wurden auf 50°C abgekühlt, mit 1 ml H₂O_{dd} versetzt und darin 10min inkubiert. Danach wurde 1,25% Ammoniummolybdat und 5% Ascorbinsäure im Verhältnis 1:1 frisch angesetzt und 0,8 ml dieser Lösung den Proben zugefügt. Der Ansatz wurde gemischt und 15 min bei 110°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt und die Absorption der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 810 nm gemessen. Zur Kalibrierung wurden 1 - 12 nmol KH₂PO₄ eingesetzt.

2.6 Radiochemische Transportmessungen

2.6.1 Synthese von [¹⁴C]-Glycinbetain

Die Synthese von [¹⁴C]-Glycinbetain aus [¹⁴C]-Cholin wurde nach der Methode von Landfald und Strøm (Landfald und Strøm, 1986) durchgeführt. Reaktionsansatz enthielt 250 µl [¹⁴C]-Cholin/Cl-Lösung (1,85 MBq; spez. Aktivität: 2,0 GBq/mmol; Hartmann Analytic) und 250 µl 0,1 M NaP_i (pH 8,0), zu dem 30 Units Cholinoxidase aus *Alcaligenes* sp. (Sigma-Aldrich) gegeben wurden. Die Reaktion wurde über Nacht bei 37°C durchgeführt und durch Zugabe von 80 µl 0,7 M Perchlorsäure abgestoppt. Das synthetisierte [¹⁴C]-Glycinbetain wurde mittels Ionenaustauschchromatographie gereinigt. Die Kationenaustauscher-Säulen (Dowex 50W) wurden durch Waschen mit 1 M HCl in die protonierte Form gebracht. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf die Säulen gegeben und das [¹⁴C]-Glycinbetain mit 2 M NH₄OH eluiert. Das Eluat wurde unter der Abzughaube getrocknet und in 2 ml H₂O aufgenommen. Die Reinheit des [¹⁴C]-Glycinbetains wurde mittels Dünnschichtchromatographie (Laufmittel: Methanol/Wasser: 50/50; Kieselgel TLC Platten, Merk) nach der Methode von Blunden (Blunden *et al.*, 1981) kontrolliert. Nach ca. 8 h Laufzeit erfolgte die Auswertung des Chromatogramms mit dem Bioimaging Analyser BAS-1800 (FUJIFILM; Raytest).

2.6.2 Messung der Glycinbetain-Aufnahme in *C. glutamicum*

2.6.2.1 Messung der Glycinbetainaufnahme in K⁺-vorbeladenen Zellen

Eine 10 ml-Flüssigkultur in BHI-Medium wurde über Tag (ca. 8 h) inkubiert. Mit dieser Kultur wurde anschließend eine 25 ml LB-Medium auf eine Start-OD₆₀₀ von ~0,1 angeimpft, mit 50 µM IPTG versetzt und über Nacht ca. 17 h inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zentrifugiert (2000 g, 5 min, 4°C) und zweimal mit 20 ml Basispuffer gewaschen und in diesem resuspendiert, so dass eine OD₆₀₀ von 2-4 eingestellt wurde. Die Zellen wurden mit 20 mM Glukose energetisiert und bis zur Messung auf Eis gelagert. Für die Betainaufnahmemessung von 1-2 h wurden die Zellen mit 60 mM Glucose supplementiert

Die Osmoschockpuffer bestanden aus dem Basispuffer, wobei die Osmolalität durch Zugabe von D-Sorbit eingestellt wurde. Vor dem Start der Messungen wurde 1 ml Zellen mit 1 ml Osmoschockpuffer für 3 min bei 30°C inkubiert und die Reaktion durch die Zugabe von 0,25 mM [¹⁴C]-Glycinbetain gestartet. Optional wurde der externe Puffer mit Tetracainhydrochlorid (TC) oder Lysophosphatidylcholin (LPC) supplementiert. Die Zugabe von TC oder LPC erfolgte 3 min vor dem Beginn der Messung. In Abständen von 15, 30, 45, 60 und 90 s wurden Proben (0,2 ml) entnommen und mit Hilfe einer Mehrfachfiltrationsanlage (FH225V; Hoefer) auf Glasfaserfilter (Typ F; Millipore) abfiltriert. Anschließend wurden die Filter zweimal mit 2,5ml 0,1 M LiCl gewaschen, bei der Langzeitbetainakkumulation wurde die 0,8 M KPi (pH 7,5) zum Waschen eingesetzt. und mit 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint ecoplus; Carl Roth) versetzt. Die aufgenommene Radioaktivität wurde mittels eines Szintillationszählers (LS 6500; Beckmann Coulter Inc.) gemessen. Nach der linearen Auftragung der gemessenen Radioaktivität gegen die Zeit konnte mithilfe der Steigung die Transportgeschwindigkeit berechnet werden.

LPC-Stocklösung

- 20 mg/ml LPC aus Eigelb (Sigma-Aldrich) in 50 % Ethanol

TC-Stocklösung

- 0,2 M TC (Sigma-Aldrich) in H₂O_{dd}

Material und Methoden

2.6.2.2 1 Messung der Glycinbetainaufnahme in K⁺-verarmten Zellen

Eine 10 ml-Flüssigkultur in BHI-Medium wurde über Nacht (ca. 17 h) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 20 ml Saline gewaschen (2000 g, 5 min, 20°C), in 25 ml MMI-Medium überführt (Start-OD₆₀₀: ~0,5) und über Tag für etwa 8 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 50 ml Saline gewaschen und in 25 ml K⁺-freies MMI mit 50 µM IPTG überimpft (Start-OD₆₀₀: ~1). Die Kultur wurde über Nacht für ca. 17 h inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (2000 g, 5 min, 4°C) und zweimal mit 20 ml K⁺-freiem Basispuffer gewaschen und in diesem resuspendiert, so dass eine OD₆₀₀ von 2-4 eingestellt wurde. Die Zellen wurden mit 10 mM Glukose energetisiert und bis zur Messung auf Eis gelagert.

Die Osmoschockpuffer bestanden aus dem K⁺-freien Basispuffer, wobei die Osmolalität durch Zugabe von D-Sorbit eingestellt wurde. Vor dem Start der Messungen wurden 1 ml Zellen mit 1 ml Osmoschockpuffer 10 min bei 30°C inkubiert. Optional wurde zu dem externen Puffer KCl (Endkonzentration: 70 µM - 2,5 mM K⁺) und Tetracainhydrochlorid (TC) oder Lysophosphatidylcholin (LPC) zugegeben. Das Experiment wurde durch die Zugabe von 0,25 mM [¹⁴C]-Glycinbetain gestartet. Die Probenahme und -präparation, sowie die Signaldetektion und die Berechnung der Transportraten erfolgten analog zu den Betainimportmessungen in K⁺-vorbeladenen Zellen.

Saline

- 0,9 % NaCl

Transport-Basispuffer

- 25 mM KPi pH 7,5
- 0,1 M NaCl

K⁺-freier Transport-Basispuffer

- 25 mM NaPi pH 8
- 0,1 M NaCl

2.6.3 Messung der Glycinbetain-Aufnahme in *E. coli*

Eine 10 ml-Flüssigkultur in LB-Medium wurde über Nacht für ca. 17 h inkubiert. Mit dieser Kultur wurde anschließend eine 25 ml Kultur mit LB-Medium auf eine Start-OD₆₀₀ von ~0,15 angeimpft. Nach dem Erreichen der OD₆₀₀ von ~0,5 wurde AHT (0,2 µg/ml) ins Medium zugegeben und die Kultur wurde je nach Experiment 15 min bis 2 h bei 37 °C kultiviert. Die Zellernte, sowie alle weiteren Schritte wurden analog zu der Betainimportmessung in K⁺-vorbeladenen *C. glutamicum* durchgeführt (s. Abschnitt 2.6.2). Jedoch wurden die Glasfaserfilter mit Zellen zweimal mit 2,5 ml 0,6 M KPi (pH 7,5) gewaschen.

2.6.4 Messungen der Glycinbetain-Aufnahme in Proteoliposomen

Ein Aliquot Proteoliposomensuspension wurde, wenn nicht anders angegeben, mit 0,1 M KPi pH 7,5 auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt, 17-mal extrudiert, mit dem gleichen Puffer auf ein Volumen von 3 ml aufgefüllt und zentrifugiert (353.000 g, 20 min, 20 °C). Die Proteoliposomen wurden in einem geringen Volumen resuspendiert und zur Transportmessung eingesetzt. Zur Messung der Transportaktivität von BetP, wurde, wenn nicht anders angegeben, externer Puffer verwendet. Die gewünschte Osmolalität im externen Puffer wurde jeweils durch Zugabe von Prolin eingestellt. Optional wurde der externe Puffer mit Tetracainhydrochlorid (TC) oder Lysophosphatidylcholin (LPC) supplementiert. Zur Transportmessung wurden zu 0,5 ml externen Puffers 15 µM [¹⁴C]-Glycinbetain und 1 µM Valinomycin zugegeben. Die Aufnahmemessung wurde durch Zugabe von 2,5 µl Proteoliposomensuspension gestartet. In Abständen 5 und 10 s wurden jeweils Proben (0,2 ml) entnommen und mit Hilfe einer Mehrfachfiltrationsanlage (FH225V; Hoefer) auf Mischester-Filter (Porengröße: 0,22 µm; Millipore). Anschließend wurden die Filter mit 2,5 ml 0,1 M LiCl gewaschen und mit 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint EcoPlus; Carl Roth) versetzt. Die aufgenommene Radioaktivität wurde mittels des Szintillationszählers (LS 6500; Beckmann Coulter Inc.) gemessen. Durch die lineare Auftragung der gemessenen Radioaktivität gegen die Zeit kann mit Hilfe der erhaltenen Steigung die Transportgeschwindigkeit berechnet werden.

Material und Methoden

Externer Puffer

- 20 mM NaP_i pH 7,5
- 25 mM NaCl

3. Ergebnisse

Der sekundär aktive Betain/ 2Na^+ -Symporter BetP aus *C. glutamicum* zeichnet sich zusätzlich durch die Eigenschaften eines Sensors und eines Regulators aus (Rübenhagen *et al.*, 2000). Untersuchungen der BetP-Regulation in Proteoliposomen demonstrierten die Beschleunigung des Betainimports bei steigender K^+ -Konzentration im Vesikellumen (Rübenhagen *et al.*, 2001). Auch in *C. glutamicum*-Zellen korrelierte die Erhöhung der intrazellulären K^+ -Konzentration mit der Zunahme der BetP-Aktivität bei nicht stimulierender externer Osmolalität (Ott, 2008). Einige Experimente deuteten jedoch darauf hin, dass die Erhöhung der internen K^+ -Konzentration nicht der einzige Stimulus ist, der von BetP wahrgenommen wird. Der alternative BetP-Stimulus ist K^+ -unabhängig und wird vermutlich über die Veränderung des physikalischen Zustands der Membran perzipiert (Henrich, 2008; Ott, 2008; Özcan *et al.*, 2007).

In dieser Arbeit wurde der K^+ -unabhängige Stimulus von BetP untersucht. Zuerst wurde die Aktivierung von BetP in seinem nativen Organismus *C. glutamicum* in Abhängigkeit der intrazellulären K^+ -Konzentration und der externen Osmolalität untersucht. Zusätzlich wurde die Auswirkung der amphipathischen Verbindungen Tetracain (TC) und Lysophosphatidylcholin (LPC) auf die BetP-Regulation analysiert. Daraufhin wurde die molekulare Aktivität von BetP in lebenden Zellen und Proteoliposomen verglichen, um den Aktivierungszustand des Transporters im *in vitro*-System zu ermitteln. Aufgrund neuer Erkenntnisse über die BetP-Interaktion mit K^+ , wurde die putative Kooperativität der K^+ -Bindung an BetP in Zellen und in Vesikeln untersucht.

3.1 Differenzierte BetP-Stimulierung in *C. glutamicum*-Zellen und Demonstration des K^+ -unabhängigen Stimulus *in vivo*

3.1.1 Differenzierte BetP-Stimulierung in *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen

Die Untersuchung der Regulation eines Proteins, dessen Aktivität durch mehrere Faktoren stimuliert wird, erfordert die unabhängige Applikation einzelner Stimuli. Um die BetP-Aktivierung zu untersuchen, muss der Transporter dem alternativen, K^+ -unabhängigen

Ergebnisse

Stimulus bei unterschiedlichen internen K^+ -Konzentrationen ausgesetzt werden. In Proteoliposomen ist dies ohne großen Aufwand möglich, da die Zusammensetzung des internen und externen Puffers variiert werden kann. Durch das Extrudieren der Proteoliposomen im Puffer mit einer definierten K^+ -Konzentration kann der interne K^+ -Gehalt eingestellt werden. In lebenden Zellen jedoch ist die Manipulation der internen K^+ -Konzentration wegen der K^+ -Homöostase sehr problematisch. Das für Bakterienzellen essenzielle K^+ ist das häufigste Kation im Zytoplasma (Booth, 1985). So wird beim Gram-negativen *E. coli* eine intrazelluläre K^+ -Konzentration von ca. 400 mM nachgewiesen (Dinnbier *et al.*, 1988), und beim Gram-positiven *C. glutamicum* 300-700 mM (Follmann *et al.*, 2009; Ochrombel *et al.*, 2011). Diese K^+ -Konzentrationen sind ausreichend, um BetP in Proteoliposomen vollständig zu aktivieren (Rübenhagen *et al.*, 2001; Schiller *et al.*, 2004). Dies bedeutet wiederum, dass BetP in lebenden Zellen bereits teilweise aktiviert ist. Um die Auswirkung einzelner Stimuli auf die BetP-Aktivität *in vivo* zu untersuchen, musste die intrazelluläre K^+ -Konzentration auf $<0,1$ M herabgesetzt werden.

Für die Untersuchung der BetP-Aktivierung sind *C. glutamicum*-Zellen ein geeignetes *in vivo*-System, da dieses Bakterium einen außergewöhnlich niedrigen K^+ -Gehalt im Zytoplasma tolerieren kann. Die Zellen sind in der Lage, in K^+ -freiem Nährmedium zu wachsen. Die interne K^+ -Konzentration sinkt nach dieser Kultivierung auf ca. 20 mM. Nach der Zugabe eines Kaliumsalzes ins Medium wird K^+ von den Zellen aufgenommen und die normale K^+ -Konzentration wird wiederhergestellt (Follmann *et al.*, 2009). Diese Tatsache bietet die Möglichkeit, den Osmoschock-assoziierten und K^+ -assoziierten Stimulus in intakten *C. glutamicum*-Zellen separat zu applizieren. Mit Osmoschock bzw. -stress ist der hyperosmotische Stress gemeint. Für die Untersuchung der BetP-Aktivierung wurde standardgemäß *C. glutamicum* DHPF pXMJ19 *betP C252T*, im Folgenden als *C. glutamicum* DHPF (pBetP) bezeichnet, verwendet. In diesem Stamm sind Gene, die für Transporter von kompatiblen Soluten kodieren, deletiert und *betP C252T* wird von einem Plasmid überexprimiert. Die im K^+ -freien bzw. K^+ -haltigen Nährmedium kultivierten Zellen werden im Weiteren als K^+ -verarmt bzw. K^+ -vorbeladen bezeichnet.

K^+ -verarmte *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen wurden 10 min bei stimulierender oder nichtstimulierender externer Osmolalität (0,24 oder 1 osmol/kg) in Gegenwart von 2,5 mM KCl oder in Abwesenheit von KCl inkubiert. Anschließend wurde die Transportmessung

Ergebnisse

durch die Zugabe von 0,25 mM [^{14}C]-Betain gestartet und die Betainaufnahme wurde für 1,5 min verfolgt, um die Initialbetainimportraten zu ermitteln (Abbildung 3.1).

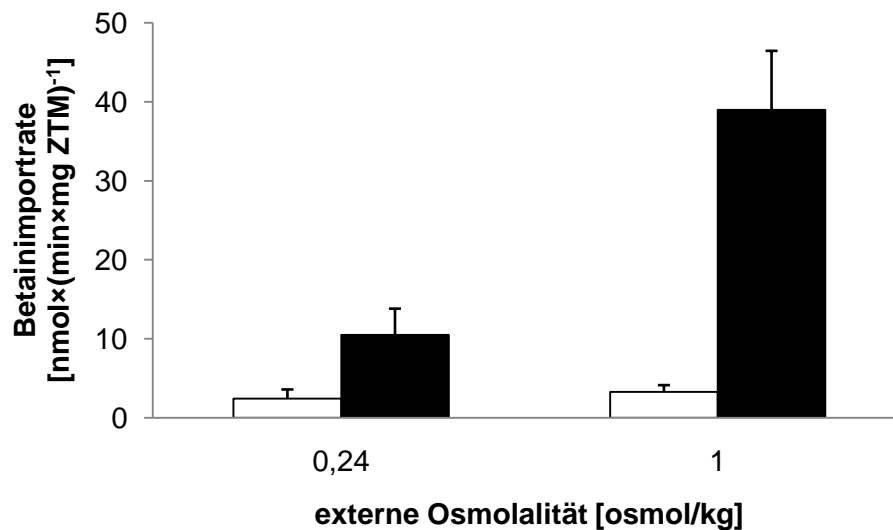


Abbildung 3.1: BetP-Transportaktivität in K^+ -verarmten *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen in Abhängigkeit der externen Osmolalität und K^+ -Supplementation. Die Zellen wurden vor der Betainzugabe 10 min bei 30 °C ohne KCl (□) oder mit 2,5 mM KCl (■) inkubiert. Externer Puffer: 0,1 M NaCl , 25 mM NaPi pH 8, 0,24 osmol/kg. Die Osmolalität des externen Puffers wurde mit Sorbit eingestellt. Die Transportmessung wurde durch die Zugabe von 0,25 mM radioaktiv markiertem Betain gestartet und 90 s lang verfolgt. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei Messungen mit Standardabweichungen.

Unter nichtstimulierenden Bedingungen (extern: 0,24 osmol/kg, ohne K^+) wurde eine basale Betainimportrate von ca. 2,5 $\text{nmol}/(\text{min} \times \text{mg ZTM})^{-1}$ detektiert. Wurden die Zellen bei niedrigosmotischen Bedingungen mit 2,5 mM KCl supplementiert, erhöhte sich die Betainimportrate auf das Vierfache der Grundaktivität. Wurden die Zellen den hochosmotischen Bedingungen (1 osmol/kg) in Abwesenheit von KCl ausgesetzt, konnte eine leichte Zunahmetendenz der Betainimportrate beobachtet werden, die jedoch keine statistische Signifikanz hatte. Bei der Kombination von hoher Osmolalität und KCl im externen Puffer war eine dramatische Erhöhung der BetP-Aktivität auf ca. 39 $\text{nmol} \times (\text{min} \times \text{mg ZTM})^{-1}$ zu beobachten.

Die Ergebnisse der differenzierten BetP-Stimulierung in *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen deuteten darauf hin, dass die BetP-Aktivierung in Anwesenheit von K^+ im externen Medium auf die Erhöhung der intrazellulären K^+ -Konzentration zurückzuführen ist. Allerdings lieferten sie keinen direkten Beweis für diese Hypothese, da die intrazelluläre

Ergebnisse

K^+ -Konzentration bei den getesteten Bedingungen nicht bekannt war. Aus diesem Grund wurde die zytoplasmatische K^+ -Konzentration in *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen unter den Bedingungen, die für die differenzierte BetP-Stimulierung verwendet wurden, gemessen (Abbildung 3.2). Für die K^+ -Quantifizierung wurde Atomemissionsspektroskopie (AES) eingesetzt. Die dargestellten intrazellulären K^+ -Konzentrationen wurden zum Zeitpunkt bestimmt, zu dem bei der analogen Transportmessung [^{14}C]-Betain zugegeben würde.

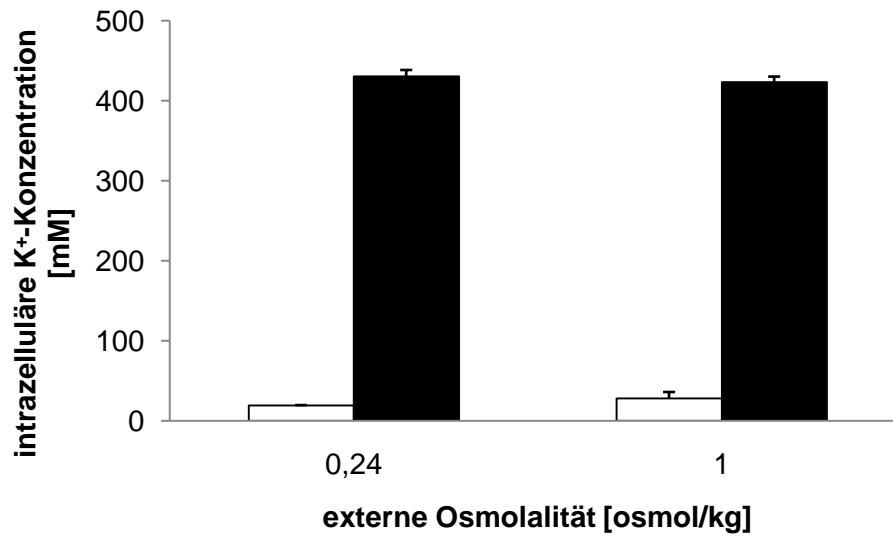


Abbildung 3.2: Intrazelluläre K^+ -Konzentration in K^+ -verarmten *C. glutamicum* DHPF(pBetP)-Zellen in Abhängigkeit der externen Osmolalität und externen K^+ -Konzentration. Die Zellen wurden vor der Betainzugabe für 10 min bei 30 °C ohne KCl (□) oder mit 2,5 mM KCl (■) inkubiert. Externer Puffer: 0,1 M NaCl, 25 mM NaPi pH 8, 0,24 osmol/kg. Die Osmolalität des externen Puffers wurde mit Sorbit eingestellt. Anschließend wurde das zytoplasmatische K^+ mittels AES quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei Messungen mit Standardabweichungen.

Die intrazelluläre K^+ -Konzentration von K^+ -verarmten *C. glutamicum*-Zellen bei 0,24 osmol/kg betrug 19 mM. Bei der Erhöhung der externen Osmolalität auf 1 osmol/kg stieg die interne K^+ -Konzentration durch die angenommene osmotisch bedingte Zellvolumenverringerng auf 27,8 mM an. Wurden die Zellen für 10 min in Gegenwart von 2,5 mM KCl inkubiert, nahm die interne K^+ -Konzentration drastisch zu und erreichte unabhängig von der externen Osmolalität ca. 425 mM.

Ergebnisse

3.1.2 Differenzierte BetP-Stimulierung in *C. glutamicum* $\Delta cglk/\Delta kup$ -Zellen und in *C. glutamicum* DHPF (pBetP $\Delta C25$)-Zellen

Um den Zusammenhang zwischen der internen K^+ -Konzentration und der BetP-Aktivität in intakten Zellen zu verdeutlichen, wurden zwei Kontrollversuche durchgeführt. Als erstes Testobjekt dienten *C. glutamicum* $\Delta cglk/\Delta kup$ -Zellen. CglK ist ein Kaliumkanal, der das Hauptaufnahmesystem für K^+ in *C. glutamicum* darstellt. Kup ist ein putativer Kaliumtransporter, der eine Homologie mit dem niedrigaffinen K^+ -Importer Kup aus *E. coli* aufweist (Follmann *et al.*, 2009). Im Stamm *C. glutamicum* $\Delta cglk/\Delta kup$ sind die beiden erwähnten K^+ -Aufnahmesysteme deletiert, so dass bei diesen Zellen kein Kaliumimport nachgewiesen werden kann und die interne K^+ -Konzentration unter 10 mM liegt. Die Betainimportrate in *C. glutamicum* $\Delta cglk/\Delta kup$ -Zellen (pBetP)-Zellen bei unterschiedlicher externer Osmolalität und externer K^+ -Konzentration wurde wie im Fall von *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen gemessen (Abbildung 3.3).

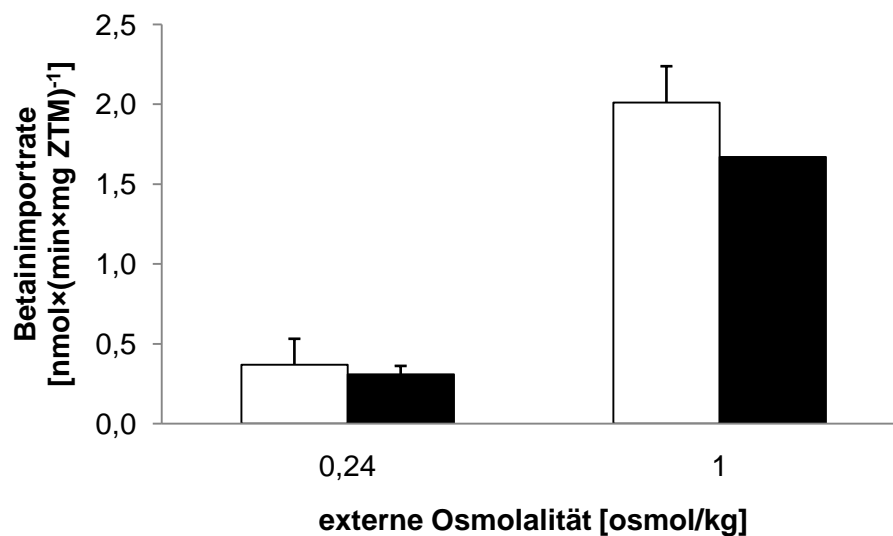


Abbildung 3.3 : BetP-Transportaktivität in *C. glutamicum* $\Delta cglk/\Delta kup$ (pBetP)-Zellen in Abhängigkeit der externen Osmolalität und K^+ -Supplementation. Die Zellen wurden vor der Betainzugabe 10 min bei 30 °C ohne KCl (□) oder mit 2,5 mM KCl (■) inkubiert. Externer Puffer: 0,1 M NaCl, 25 mM NaPi pH 8, 0,24 osmol/kg. Die Osmolalität des externen Puffers wurde mit Sorbit eingestellt. Die Transportmessung wurde durch die Zugabe von 0,25 mM radioaktiv markiertem Betain gestartet und 90 s lang verfolgt. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei Messungen mit Standardabweichungen.

In *C. glutamicum* $\Delta cglk/\Delta kup$ (pBetP)-Zellen zeigte BetP eine sehr niedrige Grundaktivität, die an der Detektionsgrenze lag. Bei der Erhöhung der externen Osmolalität nahm die

Ergebnisse

Betainimportrate signifikant zu. Durch die Supplementation des externen Mediums mit KCl konnte die BetP-Aktivität jedoch weder bei niedrig- noch bei hochosmotischen Bedingungen aktiviert werden.

Anschließend wurde die intrazelluläre K^+ -Konzentration in den Zellen unter getesteten Bedingungen gemessen (Abbildung 3.4). Bei den Kulturen, die nicht mit KCl supplementiert wurden, konnte kein intrazelluläres K^+ mittels AES nachgewiesen werden. Dies weist darauf hin, dass die intrazelluläre K^+ -Konzentration unter 1 mM lag. Wurde KCl ins externe Medium gegeben, wurden bei 0,24 bzw. 1 osmol/kg interne K^+ -Konzentrationen von 4,9 bzw. 4,4 mM K^+ gemessen.

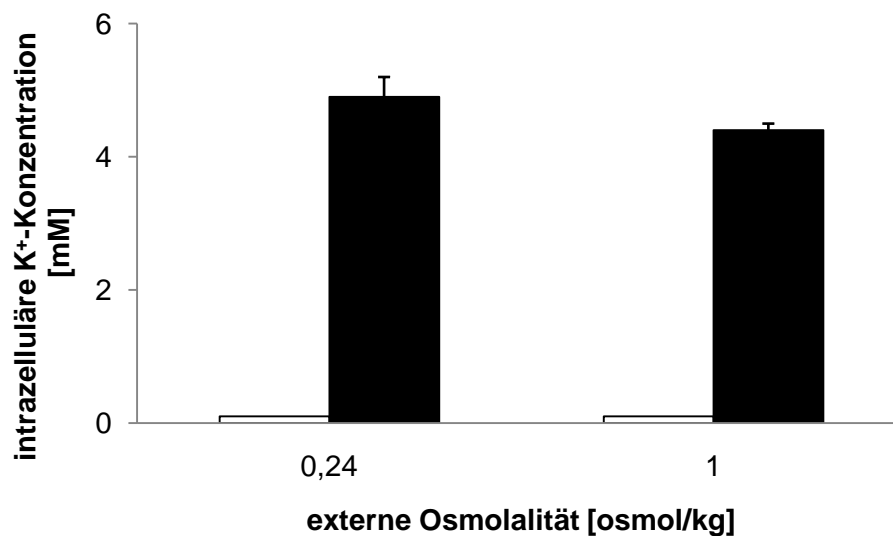


Abbildung 3.4: Intrazelluläre K^+ -Konzentration in *C. glutamicum* $\Delta cglk/\Delta kup$ (pBetP)-Zellen in Abhängigkeit der externen Osmolalität und der externen K^+ -Konzentration. Die Zellen wurden vor der Betainzugabe 10 min bei 30 °C ohne KCl (\square) oder mit 2,5 mM KCl (\blacksquare) inkubiert. Externer Puffer: 0,1 M NaCl, 25 mM NaPi pH 8, 0,24 osmol/kg. Die Osmolalität des externen Puffers wurde mit Sorbit eingestellt. Anschließend wurde das zytoplasmatische K^+ mittels AES quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei Messungen mit Standardabweichungen.

Als zweite Kontrolle wurde die differenzierte BetP-Stimulierung in *C. glutamicum* DHPF (pBetP $\Delta C25$)-Zellen durchgeführt. Im Gegensatz zu *C. glutamicum* $\Delta cglk/\Delta kup$ kann *C. glutamicum* DHPF, wie bereits demonstriert, K^+ aufnehmen. Die BetP-Variante mit der um 25 Aminosäuren verkürzten C-terminalen Domäne (BetP $\Delta C25$) zeigte sowohl in *E. coli* als auch in Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden eine konstitutive, von der externen Osmolalität unabhängige Aktivität, die ungefähr bei $\frac{1}{2} V_{\max}$ von BetP C252T lag (Schiller *et al.*, 2004).

Ergebnisse

Da die BetP-Aktivierung in Proteoliposomen auf die Erhöhung der internen K^+ -Konzentration zurückgeführt werden konnte, wurde postuliert, dass BetP $\Delta C25$ konstitutiv aktiv ist und die Änderung der K^+ -Konzentration nicht detektieren kann. Die differenzierte Stimulierung von BetP wurde in K^+ -verarmten *C. glutamicum* DHPF (pBetP $\Delta C25$)-Zellen durchgeführt (Abbildung 3.5).

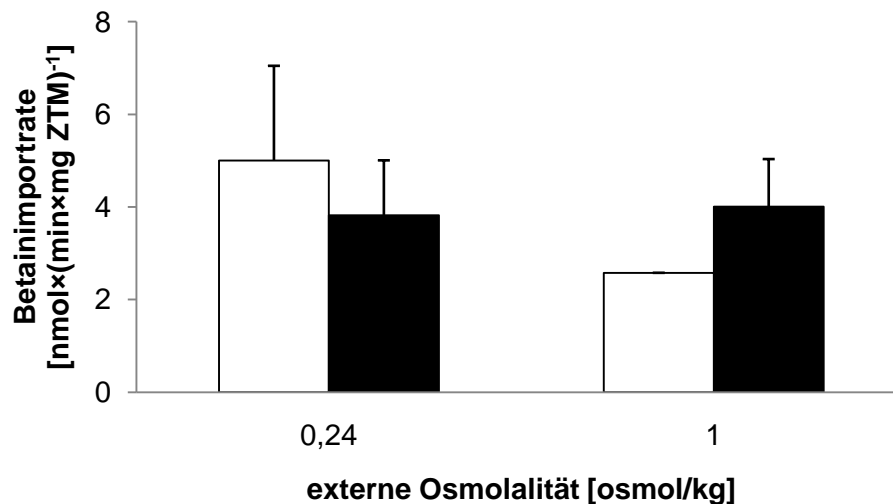


Abbildung 3.5: BetP-Transportaktivität in K^+ -verarmten *C. glutamicum* DHPF (pBetP $\Delta C25$)-Zellen in Abhängigkeit der externen Osmolalität und K^+ -Supplementation. Die Zellen wurden vor der Betainzugabe 10 min bei 30 °C ohne KCl (\square) oder mit 2,5 mM KCl (\blacksquare) inkubiert. Externer Puffer: 0,1 M NaCl, 25 mM NaPi pH 8, 0,24 osmol/kg. Die Osmolalität des externen Puffers wurde mit Sorbit eingestellt. Die Transportmessung wurde durch die Zugabe von 0,25 mM radioaktiv markiertem Betain gestartet und 90 s lang verfolgt. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei Messungen mit Standardabweichungen.

Die Grundaktivität von BetP in K^+ -verarmten *C. glutamicum* (pBetP $\Delta C25$) betrug ca. $5 \text{ nmol} \times (\text{min} \times \text{mg ZTM})^{-1}$. Bei der Erhöhung der externen Osmolalität auf 1 osmol/kg verringerte sich der Betainimport um ca. 50 %. Bei den mit KCl supplementierten Zellen betrug die Betainimportrate ca. $4 \text{ nmol} \times (\text{min} \times \text{mg ZTM})^{-1}$ sowohl bei 0,24 als auch bei 1 osmol/kg. Dieses Ergebnis demonstriert, dass BetP $\Delta C25$ weder auf die Änderung der internen K^+ -Konzentration noch auf die Fluktuationen der externen Osmolalität reagiert.

3.1.3 Differenzierte BetP-Stimulierung in *C. glutamicum*-Zellen: Zusammenfassung

Die Ergebnisse der differenzierten BetP-Stimulierung in *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen wurden in Tabelle 3.1 und Abbildung 3.6 zusammengefasst.

Ergebnisse

Tabelle 3.1: BetP-Transportaktivität in verschiedenen *C. glutamicum*-Stämmen mit unterschiedlichen BetP-Varianten in Abhängigkeit der externen Osmolalität und K⁺-Supplementation. Stimulierung: 0,24 osmol/kg, keine KCl-Zugabe (-/-); 0,24 osmol/kg, 2,5 mM KCl extern (-/K⁺); 1 osmol/kg, keine KCl-Zugabe (osmo/-); 1 osmol/kg, 2,5 mM KCl extern (osmo/K⁺). Dargestellt sind Mittelwerte von jeweils drei Messungen mit Standardabweichungen.

Stimulierung	-/-	-/K ⁺	osmo/-	osmo/K ⁺
<i>C. glutamicum</i> DHPF (pBetP)				
Betainimportrate [nmol×(min×mg ZTM) ⁻¹]	2,4 ± 1,2	10,5 ± 3,3	3,3 ± 0,9	39,0 ± 7,5
internes K ⁺ [mM]	19,1 ± 0,5	430,4 ± 8,2	27,8 ± 0,5	423,2 ± 7,2
<i>C. glutamicum</i> DHPF (pBetP ΔC25)				
Betainimportrate [nmol×(min×mg ZTM) ⁻¹]	5,0 ± 2,0	3,8 ± 1,2	2,6	4,0 ± 1,0
internes K ⁺ [mM]	19,1 ± 0,5	430,4 ± 8,2	27,8 ± 0,5	423,2 ± 7,2
<i>C. glutamicum</i> Δcglk/Δkup (pBetP)				
Betainimportrate [nmol×(min×mg ZTM) ⁻¹]	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1	2,0 ± 0,2	1,7
internes K ⁺ [mM]	n.d.	4,9 ± 0,3	n.d.	4,4 ± 0,1

Die Analyse der Ergebnisse der differenzierten BetP-Stimulierung in *C. glutamicum*-Zellen, ermöglicht mehrere Schlussfolgerungen bezüglich der Aktivierung des Transporters *in vivo*. Die Erhöhung der intrazellulären K⁺-Konzentration korreliert mit einer signifikanten Steigerung der Betainimportrate, während der hyperosmotische Schock zu einer sehr geringen, jedoch reproduzierbaren Steigerung der BetP-Aktivität führt. Die Unterbindung des K⁺-Imports in die Zellen (bei *C. glutamicum* Δcglk/Δkup) verhindert die vollständige BetP-Aktivierung, die Osmostimulierung bleibt jedoch erhalten. BetP ΔC25, das keine Änderungen der K⁺-Konzentration in Proteoliposomen detektieren kann, reagierte auch *in vivo* weder auf die Erhöhung des zytoplasmatischen K⁺-Gehalts, noch auf die Steigerung der externen Osmolalität. Die letzteren Beobachtungen implizieren, dass BetP ΔC25 zwar aktiv, aber generell nicht regulierbar ist. Die wahrscheinlich wichtigste, aus den oben dargestellten Daten resultierende Schlussfolgerung ist, dass der stimulierende Effekt von K⁺ allein nicht ausreicht, um BetP vollständig zu aktivieren. Erst wenn Zellen mit einer hohen zytoplasmatischen K⁺-Konzentration den hochosmotischen Bedingungen ausgesetzt werden, erreicht BetP die maximale Aktivität.

Ergebnisse

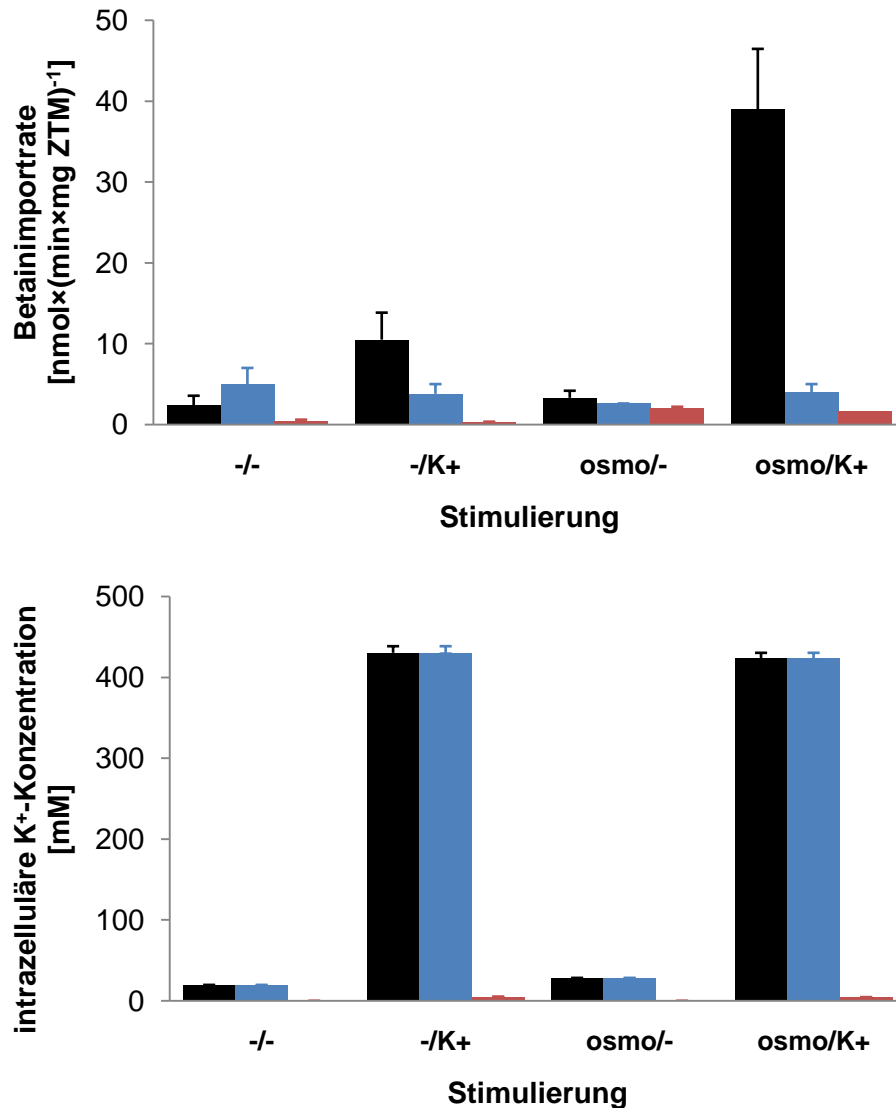


Abbildung 3.6: BetP-Transportaktivität in unterschiedlichen *C. glutamicum*-Stämmen mit unterschiedlichen BetP-Varianten in Abhängigkeit der externen Osmolalität und K^+ -Supplementation. Stimulierung: 0,24 osmol/kg, keine KCl-Zugabe (-/-); 0,24 osmol/kg, 2,5 mM KCl extern (-/K⁺); 1 osmol/kg, keine KCl-Zugabe (osmo/-); 1 osmol/kg, 2,5 mM KCl extern (osmo/K⁺). *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen (■); *C. glutamicum* DHPF (pBetP Δ C25)-Zellen (■); *C. glutamicum* Δ cglk/ Δ kup (pBetP)-Zellen (■). Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei Messungen mit Standardabweichungen.

3.2 Einfluss der amphipathischen Verbindungen auf die BetP-Aktivität in intakten Zellen und Proteoliposomen

In dieser Arbeit soll u.a. die Natur des Kaliumunabhängigen BetP-Stimulus in *C. glutamicum*-Zellen untersucht werden. Es wurde bereits demonstriert, dass die Erhöhung der intrazellulären K^+ -Konzentration allein nicht ausreichend ist, um BetP zur maximalen

Ergebnisse

Aktivität zu stimulieren. Obwohl die Natur des alternativen Stimulus nicht im Detail verstanden ist, wird vermutet, dass die Wahrnehmung des Letzteren u.a. mit der Veränderung des physikalischen Zustands der Plasmamembran verbunden ist. Die Fluktuationen der externen Osmolalität führen u.a. zur Änderung des Membrandrucks (Wood, 1999). Diese Änderung könnte von BetP detektiert werden. Daher wurde die Wirkung der Substanzen, die den physikalischen Zustands der Plasmamembran (z.B. den lateralen Membrandruck) beeinflussen, auf die Regulation der BetP-Aktivität genauer untersucht.

3.2.1 Einfluss von Lysophosphatidylcholin auf die BetP-Aktivität in intakten Zellen und in Proteoliposomen

Es wurde beschrieben, dass die Aktivität einiger Membranproteine, deren Aktivität und Regulation durch die Veränderung des lateralen Membrandrucks beeinflusst wird, auch durch Membran-aktive amphipathische Verbindungen beeinflusst werden kann. Zu solchen Verbindungen zählen auch Lysophospholipide (LPL). LPL sind Phospholipide, denen ein Acylrest fehlt. Im Gegensatz zu normalen Phospholipiden sind LPL nicht zylindrisch, sondern keilförmig. Wenn LPL in Membranen akkumulieren, können sie die freie Enthalpie der Membrandeformierung beeinflussen und somit die Membrankrümmung verändern. Dies kann wiederum das Gleichgewicht unterschiedlicher Konformationszustände der Membranproteine verändern (Andersen *et al.*, 1992; Gibson und Brown, 1993; Gruner, 1991; Keller *et al.*, 1993). Elektrophysiologische Untersuchungen des NMDAR-Kanals (ionotroper Glutamatrezeptor) zeigten, dass seine Aktivität durch das Anlegen des Unterdrucks mit Hilfe einer Pipette, durch die Verwendung von hyperosmotischen Lösungen und durch die Zugabe von Lysophospholipiden herabgesetzt werden konnte. Außerdem wurde beschrieben, dass LPL die eukaryotischen mechanosensitiven Kanäle TREK-1 und TRAAK (Maingret, 2000) sowie MscS aus *E.coli* (Martinac *et al.*, 1990) aktivieren können.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde das aus Ei isolierte Lysophosphatidylcholin (LPC) für die Untersuchung der K^+ -unabhängigen Stimulierung von BetP verwendet. Zuerst wurde getestet, ob LPC eine aktivierende Wirkung auf BetP hat. Die BetP-Aktivität wurde in K^+ -vorbeladenen *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen bei unterschiedlicher externen LPC-Konzentration ermittelt. Die Bakterien wurden bei einer externen Osmolalität von 0,24 osmol/kg für 10 min mit 1,25 - 40 μ M LPC inkubiert. Bei den Betaintransportmessungen

Ergebnisse

in intakten Zellen in Gegenwart von LPC betrug die OD_{600} im Messansatz generell 1,5-1,7. Anschließend wurden 0,25 mM [^{14}C]-Betain zur Zellsuspension zugegeben und Betainimport wurde 1,5 min lang verfolgt. Zur Kontrolle wurde die Betainaufnahme in Abwesenheit von LPC bei 0,24 sowie bei 1,2 osmol/kg gemessen (Abbildung 3.7).

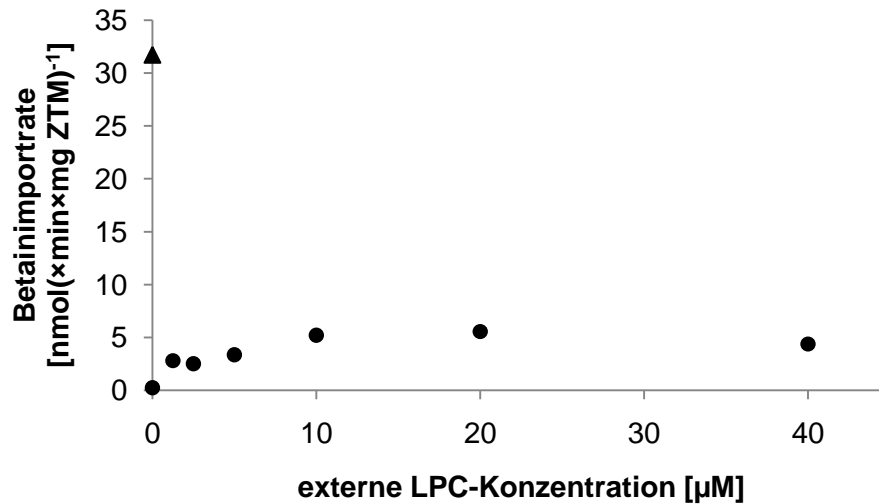


Abbildung 3.7: Einfluss von LPC auf die BetP-Transportaktivität in K^+ -vorbeladenen *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen. Die Zellen wurden vor der Zugabe von 0,25 mM [^{14}C]-Betain 10 min bei LPC-Konzentration von 0, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 oder 40 μM inkubiert. Externer Puffer: 0,1 M NaCl, 25 mM KPi pH 7,5, 0,24 osmol/kg (\bullet), optional wurde die externe Osmolalität auf 1,2 osmol/kg mit Sorbit eingestellt (\blacktriangle).

Die BetP-Aktivität nahm bei 0,24 osmol/kg mit steigendem LPC-Gehalt zu und änderte sich ab einer Konzentration von 10 μM nicht mehr signifikant. Allerdings war die Betainimportrate bei 1,2 osmol/kg mit ca. $32 \text{ nmol} \times (\text{min} \times \text{mg ZTM})^{-1}$ etwa sechsfach höher als bei niedrigosmotischen Bedingungen bei 10 μM LPC. Nach der Identifizierung des Konzentrationsoptimum von LPC für die BetP-Stimulierung wurde die Wirkung von LPC bei K^+ -vorbeladenen Zellen bei unterschiedlicher externer Osmolalität ausführlich untersucht. Die Zellen wurden bei 0,24-1,4 osmol/kg 10 min lang ohne LPC oder mit 10 μM LPC inkubiert, bevor die Transportmessung durch die Zugabe von 0,25 mM [^{14}C]-Betain gestartet wurde (Abbildung 3.8).

Ergebnisse

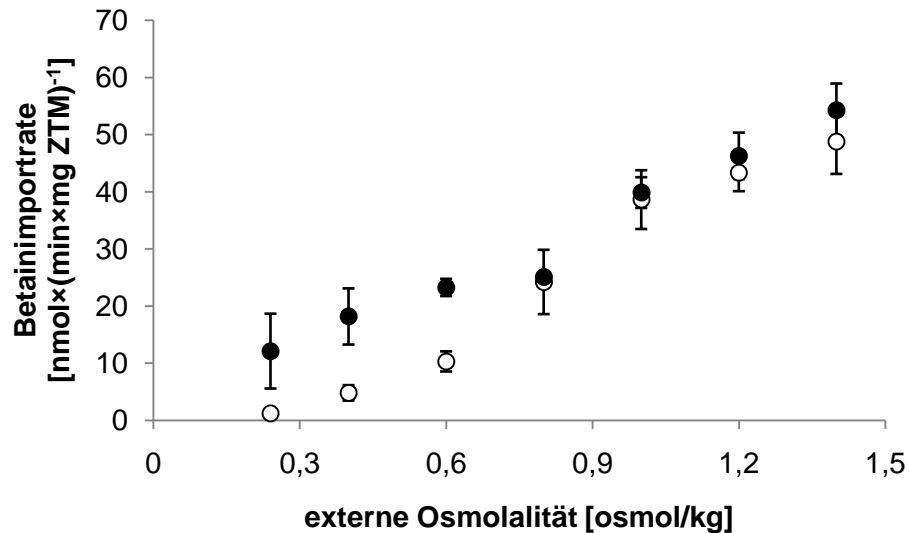


Abbildung 3.8: Einfluss von LPC auf die BetP-Transportaktivität in K^+ -vorbeladenen *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen. Die Zellen wurden vor der Zugabe von 0,25 mM [^{14}C]-Betain 10 min bei 10 mM LPC (●) oder ohne LPC (○) inkubiert. Externer Puffer: 0,1 M NaCl, 25 mM KPi pH 7,5 0,24 osmol/kg. Die externe Osmolalität wurde mit Sorbit eingestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei Messungen mit Standardabweichungen.

Bei einer externen Osmolalität von $\leq 0,6$ osmol/kg wurde bei den mit LPC inkubierten Zellen eine signifikant höhere Betainimportrate beobachtet als unter Kontrollbedingungen ohne LPC. Bei höherer externer Osmolalität zeigte LPC jedoch keinen Einfluss auf die BetP-Aktivität.

Da LPC in *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen bei geringem osmotischem Stress eine stimulierende Wirkung auf die BetP-Aktivität hatte, wurde diese Auswirkung auf die BetP-Regulation ebenfalls in Proteoliposomen untersucht. Die Betainaufnahme wurde in standardmäßigen BetP-Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden in Abhängigkeit der externen LPC-Konzentration gemessen (Abbildung 3.9). Die Messung wurde bei unterschiedlichen internen K^+ -Konzentrationen durchgeführt. Diese wurde durch die Veränderung der externen Osmolalität variiert. Proteoliposomen agieren als perfekte Osmosensoren. Durch den passiven Wasserefflux schrumpfen die Vesikel im hypertonen Medium bis sich die interne und die externe Osmolalität ausgleichen. Dadurch werden alle Membran-impermeablen inneren Solute ankonzentriert, wobei der Ankonzentrierungsfaktor dem Quotienten zwischen $Osmolalität_{ext}$ und $Osmolalität_{int}$ gleich ist (Racher *et al.*, 2001; White *et al.*, 2000). Bei den Transportmessungen in Proteoliposomen in Gegenwart von LPC betrug die Lipidkonzentration im Messansatz ca. 0,3 g/l.

Ergebnisse

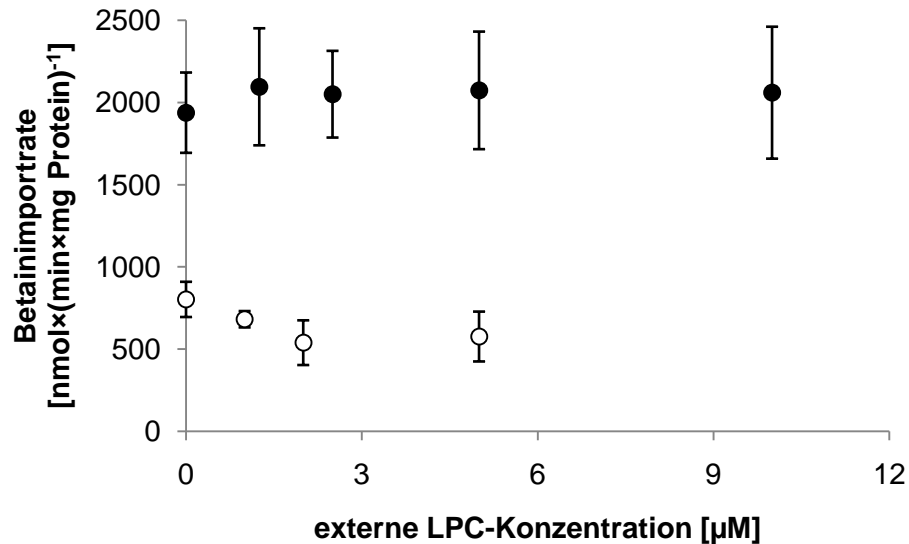


Abbildung 3.9: Einfluss von LPC auf die BetP-Transportaktivität in Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden. Externer Puffer: 20 mM NaCl, 25 mM NaPi pH 7,5, 0,1 osmol/kg. Interner Puffer 0,1 M KPi pH 7,5. Die K⁺-Konzentration im Proteoliposomenlumen wurde durch das Variieren der externen Osmolalität eingestellt und betrug ca. 180 mM (○) oder ca. 480 mM (●). Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils fünf Messungen mit Standardabweichungen.

Im Gegensatz zu *C. glutamicum*-Zellen, konnte in Proteoliposomen keine aktivierende Wirkung von LPC auf BetP nachgewiesen werden. Bei einer internen K⁺-Konzentration von ca. 180 mM konnte eine leichte Abnahme der BetP-Aktivität von ca. 800 ± 110 auf ca. 580 ± 150 nmol x (min x mg Protein)⁻¹ bei steigender externer LPC-Konzentration beobachtet werden. Bei 480 mM K⁺ intern wurde eine konstante Betainimportrate von ca. 2040 ± 300 nmol x (min x mg Protein)⁻¹ festgestellt. Es wurde vermutet, dass die fehlende Stimulierung von BetP durch LPC, die in *C. glutamicum*-Zellen beobachtet wurde, auf die unterschiedliche Membranzusammensetzung der *C. glutamicum*-Zellen und *E. coli*-Liposomen zurückzuführen ist. Um diese Hypothese zu kontrollieren, wurde der Einfluss des LPC auf die BetP-Aktivität in *E. coli* MKH13 (pBetP)-Zellen untersucht, da sie eine ähnliche Membranzusammensetzung wie die Proteoliposomen haben. Analog zu den Transportversuchen mit *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen, wurde *E. coli* MKH13 (pBetP)-Zellen vor der Betainzugabe 10 min lang bei unterschiedlicher externer Osmolalität mit 10 µM LPC inkubiert. Die Ergebnisse der Betainimportmessung unter diesen Bedingungen sind in Abbildung 3.10 dargestellt.

Ergebnisse

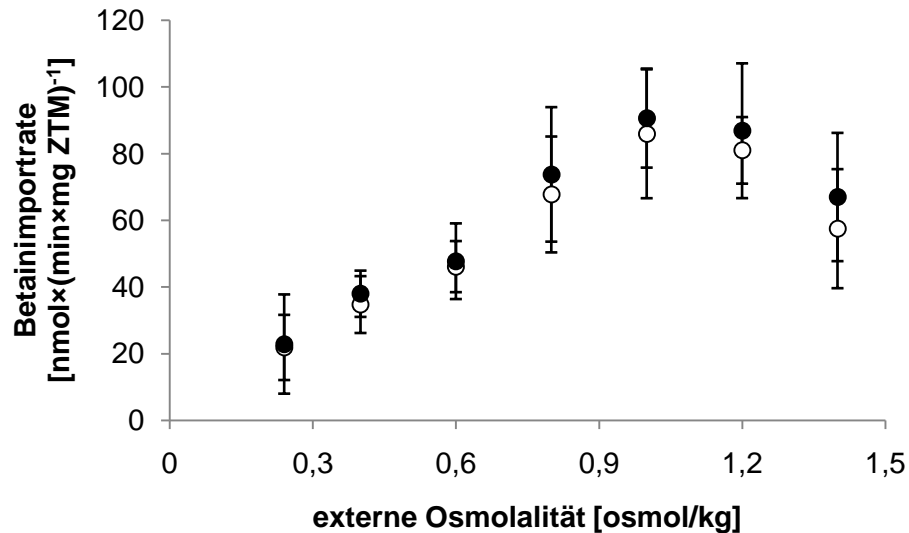


Abbildung 3.10: Einfluss von LPC auf die BetP-Transportaktivität in *E. coli* MKH13 (pBetP)-Zellen. Die Zellen wurden vor der Zugabe von 0,25 mM [14 C]-Betain 10 min bei 10 μ M LPC (●) oder ohne LPC (○) inkubiert. Externer Puffer: 0,1 M NaCl, 25 mM KPi pH 7,5, 0,24 osmol/kg. Die externe Osmolalität wurde mit Sorbit eingestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei Messungen mit Standardabweichungen.

Die BetP-Aktivität in *E. coli* MKH13 (pBetP)-Zellen wurde durch LPC nicht signifikant beeinflusst. Diese Beobachtung führte zur Hypothese, dass LPC keinen aktivierenden Effekt auf BetP in der Membran aus *E. coli*-typischen Lipiden hat, die auch für die Herstellung der Liposomen verwendet wurden. Es wurde vermutet, dass LPC die BetP-Aktivität in Proteoliposomen stimulieren könnte, wenn die Lipidzusammensetzung der Liposomenmembran der Plasmamembran von *C. glutamicum* ähnlich ist. Die aus *E. coli*-Lipiden hergestellten BetP-Proteoliposomen wurden durch mehrere Frieren/Tauen-Zyklen mit synthetischem POPG fusioniert, weil POPG einer der am häufigsten vorkommenden Lipide in der Membran von *C. glutamicum*-Zellen ist (Özcan *et al.*, 2007). Der Anteil des synthetischen POPG in den derart präparierten Proteoliposomen betrug 2/3. Die Auswirkung des LPC auf den Betainimport in den POPG-reichen Vesikeln wurde analog zu den *E. coli*-Proteoliposomen untersucht. Die Betainaufnahme wurde in Abhängigkeit der externen LPC-Konzentration gemessen. Die intraliposomale K^+ -Konzentration wurde durch Variieren der externen Osmolalität eingestellt (Abbildung 3.11). In POPG-reichen Proteoliposomen wurde unabhängig von der internen K^+ -Konzentration keine stimulierende Wirkung des LPC auf die BetP-Aktivität beobachtet.

Ergebnisse

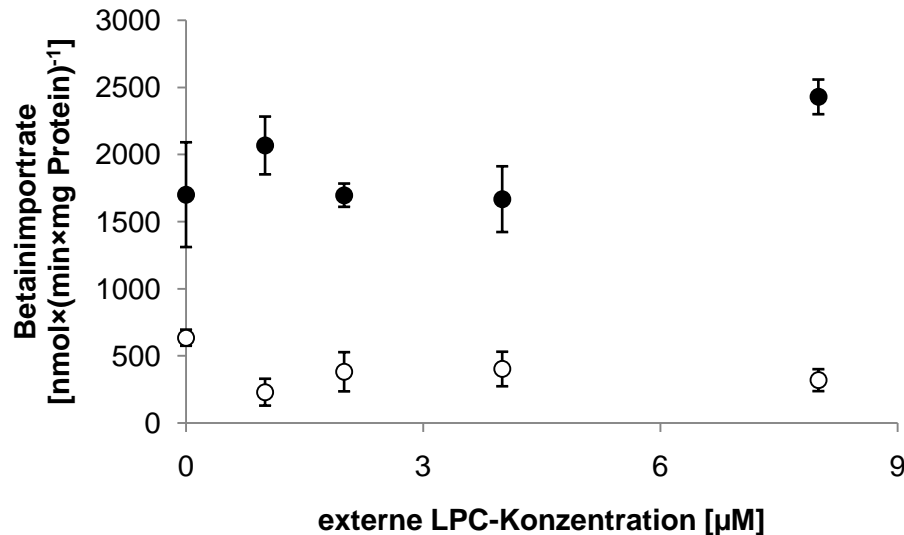


Abbildung 3.11: Einfluss von LPC auf die BetP-Transportaktivität in POPG-reichen Proteoliposomen. Lipidzusammensetzung der Vesikeln: 1/3 *E. coli*-Lipide, 2/3 synthetisches POPG. Externer Puffer: 20 mM NaCl, 25 mM NaPi pH 7,5, 0,1 osmol/kg. Interner Puffer 0,1 M KPi pH 7,5. Die K⁺-Konzentration im Proteoliposomenlumen wurde durch das Variieren der externen Osmolalität eingestellt und betrug ca. 180 mM (○) oder ca. 480 mM (●). Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils fünf Messungen mit Standardabweichungen.

Zusammenfassend konnte in *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen ein aktivierender Effekt von LPC auf die BetP-Aktivität festgestellt werden, jedoch nur bei der externen Osmolalität von $\leq 0,6$ osmol/kg. Unter den getesteten Bedingungen war jedoch keine BetP-Stimulierung durch das LPC in *E. coli* MKH13 (pBetP)-Zellen sowie in Proteoliposomen mit der *E. coli*- bzw. *C. glutamicum*-ähnlichen Membranzusammensetzung zu beobachten. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Transportversuche mit LPC durchgeführt.

3.2.2 Einfluss von Tetracain auf die BetP-Aktivität in intakten Zellen und in Proteoliposomen

Eine weitere amphiphile Verbindung, deren Effekt auf die BetP-Aktivität getestet wurde, ist Tetracain (TC), das für die lokale Anästhesie eingesetzt wird. TC kann den physikalischen Zustand einer Membran signifikant beeinflussen (Auger *et al.*, 1988). Es wurde bereits demonstriert, dass TC sowohl in *C. glutamicum* als auch in BetP-Proteoliposomen BetP stimulieren kann (Peter *et al.*, 1998; Rübenhagen, 2001).

Ergebnisse

Zuerst wurde die Auswirkung von unterschiedlichen TC-Konzentrationen auf die BetP-Aktivität in K^+ -vorbeladenen *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen bei niedrigosmotischen Bedingungen getestet. Die Zellen wurden bei einer externen Osmolalität von 0,24 osmol/kg 3 min lang mit 0,2 - 1 mM TC inkubiert. Anschließend wurden 0,25 mM [^{14}C]-Betain zur Zellsuspension zugegeben und Betainimport wurde 1,5 min lang verfolgt (Abbildung 3.12). Bei den Betaintransportmessungen in intakten Zellen in Gegenwart von TC betrug die OD_{600} im Messansatz generell 1,5-1,7.

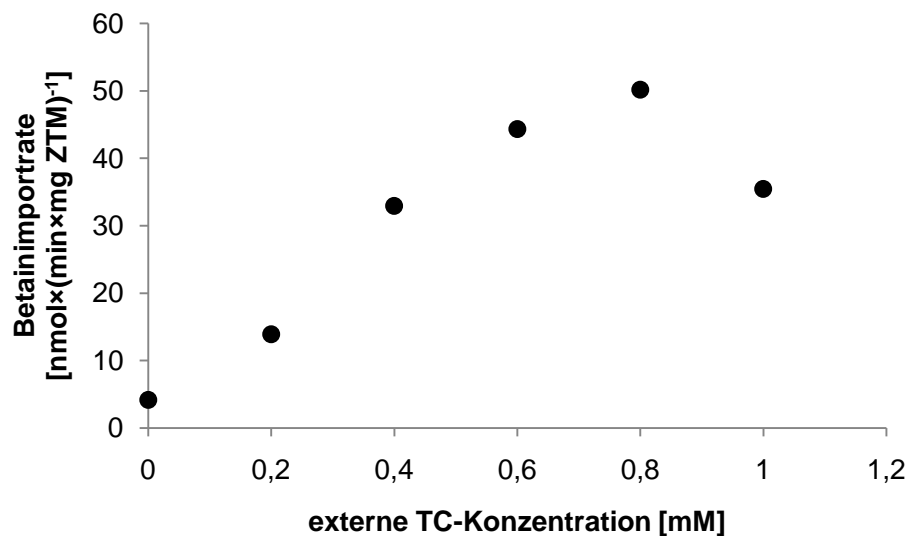


Abbildung 3.12: Einfluss von TC auf die BetP-Transportaktivität in K^+ -vorbeladenen *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen. Die Zellen wurden vor der Zugabe von 0,25 mM [^{14}C]-Betain 3 min bei TC-Konzentrationen von 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 oder 1 mM inkubiert. Externer Puffer: 0,1 M NaCl, 25 mM KPi pH 7,5, 0,24 osmol/kg.

Die maximal gemessene Betainimportrate von ca. $50 \text{ nmol} \times (\text{min} \times \text{mg ZTM})^{-1}$, die bei einer externen TC-Konzentration von 0,8 mM festgestellt wurde, war um das Zwölfwache höher als die Grundaktivität von BetP in Abwesenheit von TC. Nach der Identifizierung des Konzentrationsoptimums von TC für die BetP-Stimulierung wurde der Effekt von TC auf die Betainimportrate in K^+ -vorbeladenen Zellen bei unterschiedlicher externer Osmolalität ausführlicher untersucht. Die Zellen wurden bei 0,24 - 1,4 osmol/kg 3 min lang ohne TC oder mit 0,8 mM TC inkubiert, bevor die Transportmessung durch die Zugabe von 0,25 mM [^{14}C]-Betain gestartet wurde (Abbildung 3.13).

Ergebnisse

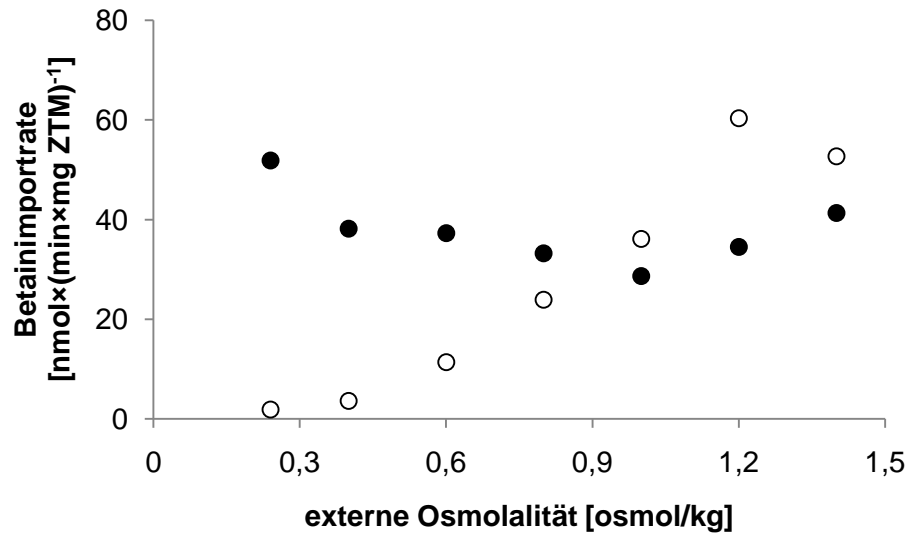


Abbildung 3.13: Einfluss von TC auf die BetP-Transportaktivität in K^+ -vorbeladenen *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen. Die Zellen wurden vor der Zugabe von 0,25 mM [^{14}C]-Betain 3 min bei 0,8 mM TC (●) oder ohne TC (○) inkubiert. Externer Puffer: 0,1 M NaCl, 25 mM KPi pH 7,5, 0,24 osmol/kg. Die externe Osmolalität wurde mit Sorbit eingestellt.

In TC-freiem externem Medium konnte man bei der Erhöhung der externen Osmolalität eine charakteristische Steigerung der BetP-Aktivität beobachten, die bei 1,2 osmol/kg einen maximalen Wert von ca. 60 $\text{nmol} \times (\text{min} \times \text{mg ZTM})^{-1}$ erreichte. In Anwesenheit von TC erhöhte sich die Betainimportrate auf ca. 51 $\text{nmol} \times (\text{min} \times \text{mg ZTM})^{-1}$ bereits bei 0,24 osmol/kg, verringerte sich jedoch bei Erhöhung der externen Osmolalität um ca. 30 % und blieb dann relativ konstant.

Anschließend wurde der Einfluss von TC auf die BetP-Aktivität auch in K^+ -verarmten *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen in unterschiedlichen Kombinationen mit anderen Stimuli untersucht. Die Zellen wurden vor der Betainzugabe mit oder ohne 2,5 mM KCl für 10 min inkubiert. Die Supplementation mit 0,8 mM TC erfolgte 3 min lang vor der Betainzugabe. Die Osmolalität des externen Mediums betrug 0,24 oder 1 osmol/kg (Abbildung 3.14).

Ergebnisse

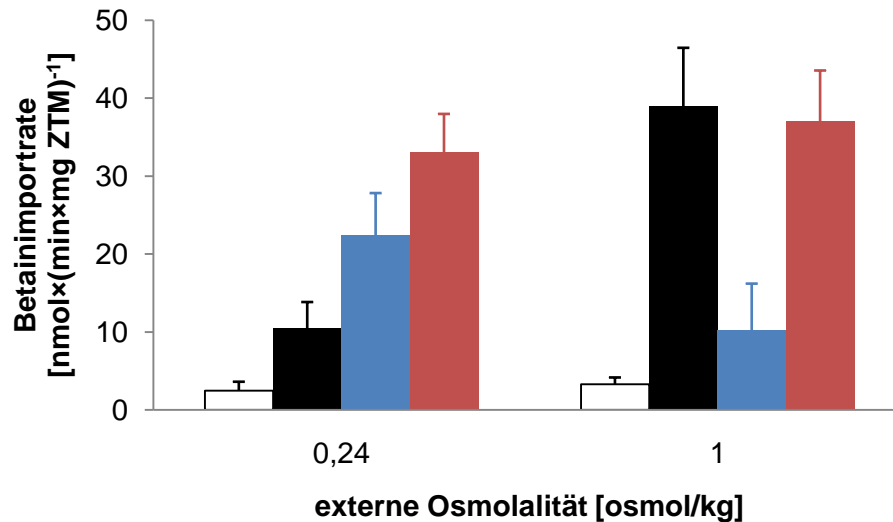


Abbildung 3.14 :Einfluss von TC auf die BetP-Transportaktivität in K^+ -verarmten *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen in Abhängigkeit der externen Osmolalität und K^+ -Konzentration. Externer Puffer: 0,1 M NaCl, 25 mM NaPi pH 8, 0,24 osmol/kg; die Pufferosmolalität wurde mit Sorbit eingestellt. Die Zellen wurden vor dem Messungsbeginn 10 min im externen Puffer inkubiert. Der Puffer enthielt optional 2,5 mM oder/und 0,8 mM TC (Letzteres wurde 3 min vor der Betainzugabe hinzugefügt). (□) keine KCl- oder TC-Zugabe, (■) nur KCl-Zugabe, (■) nur TC-Zugabe, (■) KCl- und TC-Zugabe. Dargestellt sind Mittelwerte von drei Messungen mit Standardabweichungen.

Die Betainimportrate erreichte in Gegenwart von TC bereits in K^+ -verarmten Zellen bei niedrigosmotischen Bedingungen ca. 57 % der maximalen Aktivität, welche bei kombinierter K^+ -/Osmostimulierung registriert wurde, und ca. 39 $\text{nmol} \times (\text{min} \times \text{mg ZTM})^{-1}$ betrug. Das Ausmaß der durch TC verursachten BetP-Aktivierung war um eine Größenordnung höher als bei der reinen Osmostimulierung. Wurden TC und K^+ gleichzeitig appliziert, erreichte BetP eine höhere Aktivität (33 $\text{nmol} \times (\text{min} \times \text{mg ZTM})^{-1}$) als nur in Gegenwart von TC, jedoch nicht die maximale Aktivität. Interessanterweise, wurde die stimulierende TC-Wirkung auf die Betainaufnahme bei hochosmotischen Bedingungen schwächer. Die BetP-Aktivität bei niedriger interner K^+ -Konzentration war bei 0,24 osmol/kg ca. doppelt so hoch wie bei 1 osmol/kg. Wurde TC zu den vollstimulierten Zellen gegeben (Osmostress und K^+), war keine weitere Zunahme der Betainimportrate zu beobachten.

Die Abnahme der Betainimportrate in Zellen mit einer niedrigen internen K^+ -Konzentration bei steigender externer Osmolalität und TC-Anwesenheit provozierte folgende Vermutung: neben einer stimulierenden Wirkung auf BetP könnte TC eine schädigende Wirkung auf die Zellen haben. Wegen seines amphipathischen Charakters kann TC in der Plasmamembran akkumulieren und bei einer bestimmten Konzentration eventuell die Membranintegrität

Ergebnisse

beeinflussen (Kitagawa *et al.*, 2004; Leung und Rawal, 1977). Dies wiederum könnte zur Abnahme des elektrochemischen Membranpotentials führen. Da Betaintransport über BetP durch den elektroden getriebenen Na^+ -Symport energetisiert wird, würde die Abnahme des Membranpotentials die Betainimportrate verringern. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Betainakkumulation in *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen bis zum Einstellen des Gleichgewichtszustands, bei dem kein Netto-Betainimport stattfindet, gemessen. Die Menge des dabei akkumulierten Betains hängt vom Membranpotential ab, dessen Verringerung die interne Betainkonzentration reduzieren würde. Die Betainakkumulation wurde bei einer externen Osmolalität von 1,5 osmol/kg in Gegenwart von 0 - 1 mM TC 120 min lang verfolgt (Abbildung 3.15).

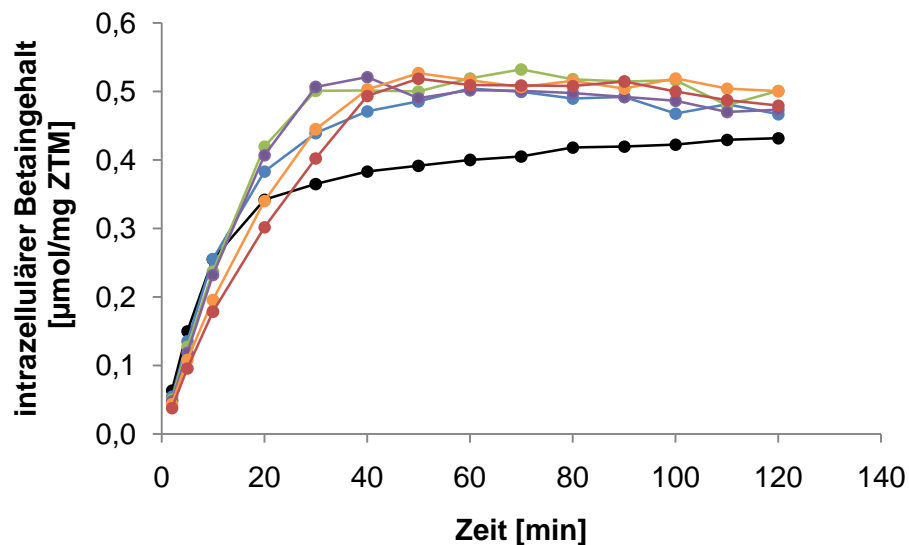


Abbildung 3.15: Betainakkumulation in K^+ -vorbeladenen *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen. Externer Puffer: 0,1 M NaCl, 25 mM KPi pH 7,5, die externe Osmolalität wurde durch die Zugabe von Sorbit auf 1,5 osmol/kg eingestellt (●). Der externe Puffer wurde optional mit 0,2 (●); 0,4 (●); 0,6 (●); 0,8 (●) oder 1 (●) mM TC supplementiert. Die Zellen wurden 2 min im externen Puffer vor der Zugabe von 0,5 mM [^{14}C]-markiertem Betain inkubiert.

Die maximale intrazellulär akkumulierte Betainmenge bei externen TC-Konzentrationen von 0,2 - 1 mM stagnierte bei ca. 0,5 $\mu\text{mol/mg ZTM}$. In Abwesenheit von TC wurden höchstens 0,43 $\mu\text{mol/mg ZTM}$ akkumuliert. Dieses Ergebnis demonstriert indirekt, dass die zuvor für die BetP-Stimulierung verwendete TC-Konzentration von 0,8 mM keine Verringerung des Membranpotentials bei *C. glutamicum*-Zellen hervorruft.

Ergebnisse

Um die stark aktivierende Wirkung von TC auf BetP in K^+ -verarmten Zellen bei niedriger externer Osmolalität besser zu verstehen, wurde ein Kontrollversuch durchgeführt. In diesem Experiment wurde der Einfluss von TC und hyperosmotischem Schock auf die Aktivität von BetP $\Delta C45$ untersucht. Diese BetP-Variante mit der um 45 Aminosäuren verkürzten C-terminalen Domäne weist in *E. coli* und in Proteoliposomen eine vollständig deregulierte Aktivität (Schiller *et al.*, 2004) auf. Die *C. glutamicum* DHPF (pBetP $\Delta C45$)-Zellen wurden entweder einer sukzessiven Erhöhung der externen Osmolalität in Abwesenheit von TC oder einer zunehmenden TC-Konzentration bei niedrigosmotischen Bedingungen ausgesetzt und die Betainimportrate wurde gemessen (Abbildung 3.16).

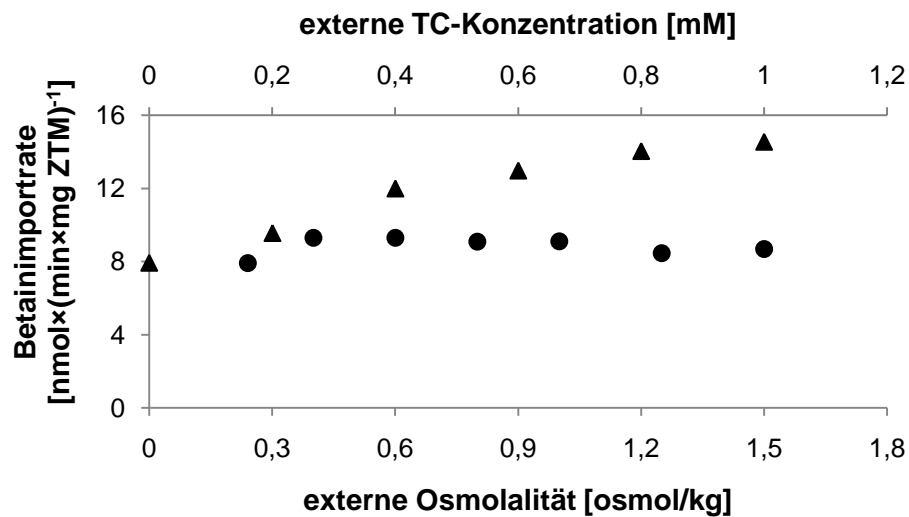


Abbildung 3.16: BetP-Aktivität in K^+ -vorbeladenen *C. glutamicum* DHPF (pBetP $\Delta C45$)-Zellen in Abhängigkeit der externen Osmolalität und TC-Konzentration. Die Zellen wurden vor der Betainzugabe 3 min bei 30 °C im externen Puffer inkubiert. Externer Puffer: 0,1 M NaCl, 25 mM KPi pH 7,5, 0,24 osmol/kg. (●): Die Osmolalität des externen Puffers wurde durch die Sorbit-Zugabe erhöht. (▲): Die externe Osmolalität betrug 0,24 und der Puffer wurde mit 0,2-1 mM TC supplementiert. Die Transportmessung wurde durch die Zugabe von 0,25 mM [^{14}C]-markiertem Betain gestartet und 90 s lang verfolgt.

Während BetP $\Delta C45$ auf die Änderungen der externen Osmolalität nicht reagierte, wurde bei steigender externer TC-Konzentration eine Erhöhung der Betainimportrate um das ca. Zweifache festgestellt. Dieses Ergebnis impliziert, dass TC einen stimulierenden Effekt auf BetP ausüben kann, der sich jedoch vom osmo-assoziierten Stimulus unterscheidet. Dies erklärt auch, warum in K^+ -verarmten Zellen die TC-bedingte Stimulierung der BetP-Aktivität signifikant stärker war als die Osmostimulierung.

Ergebnisse

Um die TC-bedingte BetP-Aktivierung besser zu verstehen, musste sie auch *in vitro* untersucht werden. Ähnliche Versuche wurden bereits in einer früheren Arbeit durchgeführt (Rübenhagen, 2001). Dabei wurde festgestellt, dass die Erhöhung der Betainimportrate in Gegenwart von TC in Proteoliposomen nur bei leicht saurem internem pH-Wert von 6,5 stattfindet. Bei einem internen pH-Wert von 7,5, wurde keine signifikante BetP-Stimulierung bei der Erhöhung der TC-Konzentration beobachtet. In dieser Arbeit wurde eine tiefere Untersuchung des Mechanismus der TC-Auswirkung auf die BetP-Regulation in Lipidvesikeln vorgenommen.

Wie bereits erwähnt, werden die BetP-Proteoliposomen standardgemäß mit 0,1 M KPi (pH 7,5) präpariert. Deshalb wurde der interne Puffer in den Vesikeln gegen KPi mit pH 6,5 ausgetauscht. Um die BetP-Aktivität in Proteoliposomen bei unterschiedlichem Aktivierungszustand zu untersuchen, wurde auch die KPi-Konzentration variiert. Es wurden Vesikel mit 50 mM und 200 mM KPi präpariert, was bei einem pH-Wert von 6,5 70 mM K^+ (nicht stimulierende K^+ -Konzentration) bzw. 280 mM K^+ (stimulierende K^+ -Konzentration) entspricht. Es fällt auf, dass die niedrigste interne K^+ -Konzentration in K^+ -verarmten *C. glutamicum*-Zellen, bei der die BetP-Aktivität gemessen wurde (ca. 20 mM), signifikant niedriger als in den Proteoliposomen war. Es gelang allerdings nicht, den Betainimport in Vesikeln mit weniger als 70 mM K^+ intern zu messen (Daten nicht gezeigt). Der wahrscheinliche Grund hierfür ist, dass bei niedrigen lumenalen K^+ -Konzentrationen kein ausreichendes K^+ -Diffusionspotential, durch welches der Betainimport in den Vesikeln energetisiert wird, mithilfe des Valinomycins generiert werden kann.

Die Betainaufnahme in BetP-Proteoliposomen mit einem internem pH-Wert von 6,5 und unterschiedlichen internen K^+ -Konzentrationen wurde in Abhängigkeit der externen TC-Konzentration gemessen. Um die Entstehung eines Protonengradienten über die Proteoliposomenmembran zu vermeiden, wurde der pH-Wert des externen Puffers ebenfalls auf 6,5 eingestellt. Der externe und der interne Puffer waren isoosmotisch. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Abbildung 3.17 dargestellt. Bei den Transportmessungen in Proteoliposomen in Gegenwart von TC betrug die Lipidkonzentration im Messansatz ca. 0,3 g/l.

Ergebnisse

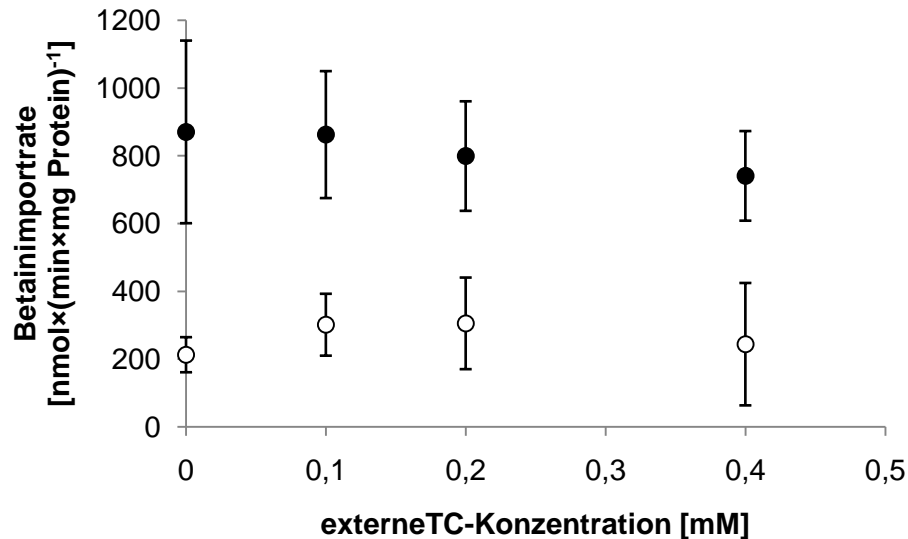


Abbildung 3.17: Einfluss von TC auf die BetP-Transportaktivität in Proteoliposomen. Interner Puffer: 50 mM KPi, pH 6,5 (70 mM K⁺) (○); 200 mM KPi, pH 6,5 (280 mM K⁺) (●). Externer Puffer: 20 mM NaCl, 25 mM NaPi pH 6,5; 0,1 osmol/kg. Die externe Osmolalität wurde auf den Wert der internen Osmolalität mit Sorbit eingestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte der jeweils dreißig Messungen mit Standardabweichungen.

In Proteoliposomen mit einer internen K⁺-Konzentration von 280 mM zeigte die BetP-Aktivität bei der Erhöhung der externen TC-Konzentration eine leichte Abnahmetendenz. Bei 70 mM K⁺ intern wurde im Gegenteil bei steigender TC-Konzentration eine leichte Zunahmetendenz der BetP-Aktivität beobachtet. Die beiden Tendenzen hatten jedoch keine statistische Signifikanz.

Um zu überprüfen, ob die schwache, bzw. fehlende TC-bedingte Stimulierung von rekonstituiertem BetP durch die unterschiedliche Membranzusammensetzung von *C. glutamicum*-Zellen und *E. coli*-Proteoliposomen hervorgerufen werden könnte, wurde die Auswirkung von TC auf die BetP-Aktivität in *E. coli* MKH13 (pBetP)-Zellen getestet. Die Zellen wurden bei einer externen Osmolalität von 0,24 osmol/kg für 3 min mit 0,2 - 0,8 mM TC inkubiert. Anschließend wurden 0,25 mM [¹⁴C]-Betain zur Zellsuspension zugegeben und der Betainimport wurde 1,5 min lang verfolgt (Abbildung 3.18).

Ergebnisse

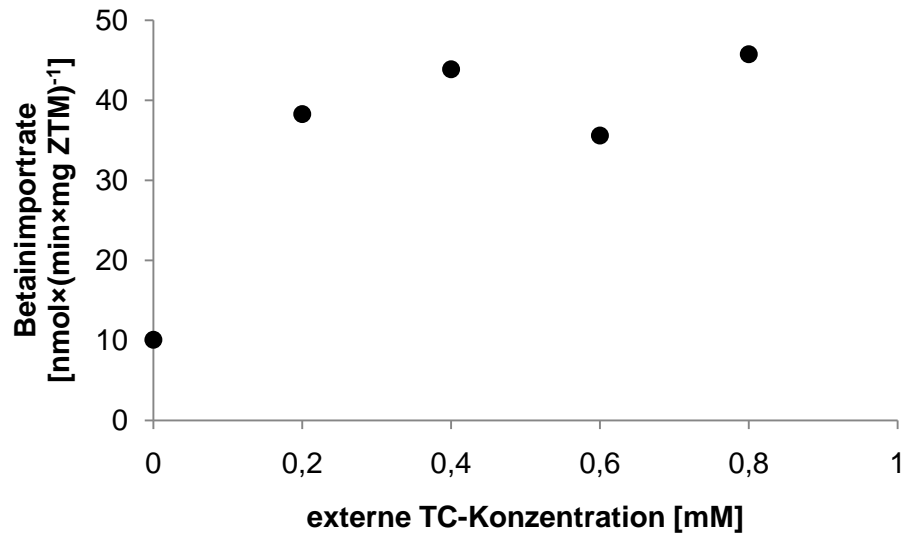


Abbildung 3.18: Einfluss von TC auf die BetP- Transportaktivität in *E. coli* MKH13 (pBetP)-Zellen. Die Zellen wurden vor der Zugabe von 0,25 mM [¹⁴C]-Betain 3 min bei TC-Konzentrationen von 0, 0,2, 0,4, 0,6 oder 0,8mM inkubiert. Externer Puffer: 0,1 M NaCl, 25 mM KPi, pH 7,5, 0,24 osmol/kg.

Die Betainimportrate erhöhte sich in Gegenwart von TC und erreichte bereits bei 0,4 mM TC den höchsten Wert. Dieses Ergebnis demonstriert, dass BetP auch in der *E. coli*-Plasmamembran durch TC aktiviert werden kann. Demzufolge ist die Lipidzusammensetzung der Proteoliposomenmembran nicht für die schwache bzw. fehlende BetP-Stimulierung verantwortlich. Diese Tatsache warf die Frage nach dem Aktivierungszustand von BetP in Vesikeln auf. Wie bereits erwähnt, war die Erhöhung der internen K⁺-Konzentration in Proteoliposomen der einzige identifizierte Parameter, der BetP *in vitro* aktivierte. Die in einer früheren (Ott, 2008) und in dieser Arbeit durchgeführten Versuche demonstrierten, dass der K⁺-assoziierte Stimulus für die vollständige BetP-Aktivierung in *C. glutamicum*-Zellen nicht ausreichend ist. Nur die konzertierte Wirkung des K⁺-abhängigen und des alternativen Stimulus, der z.B. bei hochosmotischen Bedingungen aktiv wird, führt zur maximalen Betainimportrate in lebenden Zellen. Obwohl dieser alternative Stimulus in Proteoliposomen bisher nicht nachgewiesen wurde, kann man nicht ausschließen, dass er mit den durchgeführten Experimenten nicht detektiert werden konnte. Somit könnte der Aktivierungszustand von BetP in Proteoliposomen durch zwei Modelle beschrieben werden. Im ersten Modell würde BetP in Vesikeln in analogem Zustand wie in Zellen unter niedrigosmotischen Bedingungen vorliegen. Bei einer hohen internen K⁺-Konzentration würde der Transporter dann nur teilweise stimuliert werden. Im zweiten Modell würde BetP im ähnlichen Zustand wie Zellen beim osmotischen Schock vorliegen. Die Zunahme des internen K⁺-Gehalts würde das Protein dann vollständig aktivieren. So

Ergebnisse

konnte z.B. die Betainimportrate *in vivo* bei der kombinierten K^+ -/Osmostimulierung nicht weiter durch TC gesteigert werden (Abbildung 3.14). Um zwischen den zwei vorgeschlagenen Modellen zu entscheiden, wurde das BetP-Aktivierungsprofil in Proteoliposomen mit dem in *C. glutamicum*-Zellen bei unterschiedlicher externen Osmolalität verglichen. Dafür wurden die Betainimportraten relativiert, wobei jeweils die BetP-Aktivität bei gleichzeitiger K^+ - und TC-Stimulierung als 100 % gesetzt wurde (Abbildung 3.19).

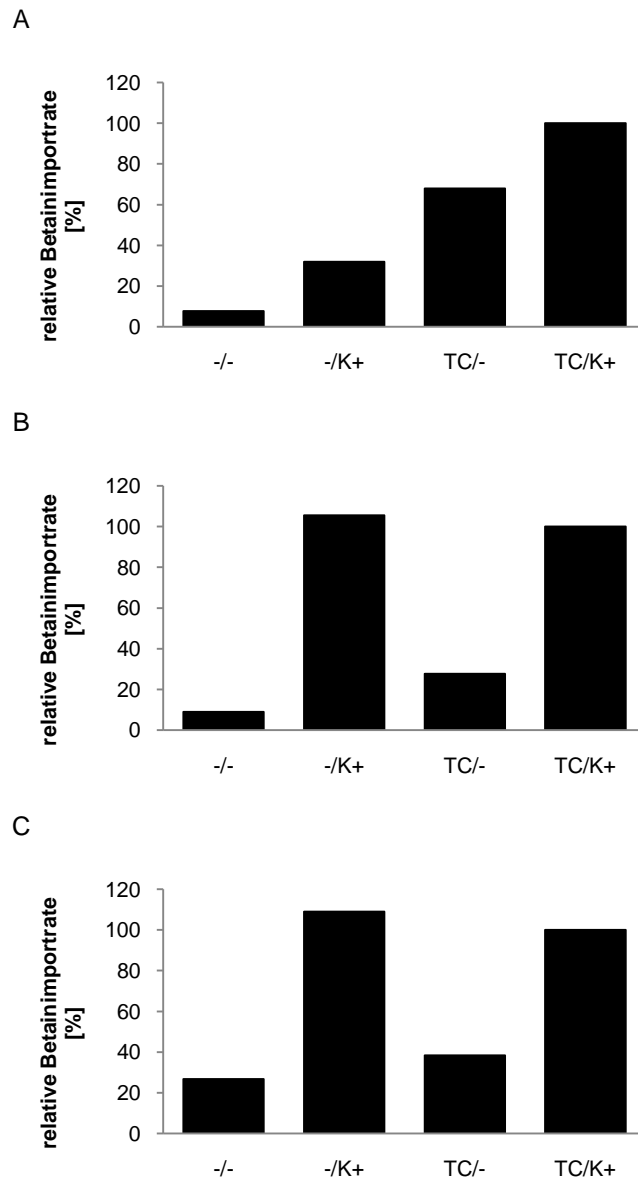


Abbildung 3.19: Aktivierungsprofil von BetP in *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen und Proteoliposomen bei differenzierter Stimulierung. Die Betainimportrate in Gegenwart von TC und K^+ wurde auf 100 % gesetzt. A: Zellen bei 0,24 osmol/kg extern; B: Zellen bei 1,0 osmol/kg extern; C: Proteoliposomen bei isoosmotischen Bedingungen. K^+ : hohe interne K^+ -Konzentration (K^+ -stimuliert), TC: 0,8 mM extern (A und B) bzw. 0,2 mM extern (C).

Ergebnisse

Das Aktivierungsprofil von BetP in Proteoliposomen und in Zellen, die hyperosmotischen Bedingungen ausgesetzt waren, ist sehr ähnlich. In beiden Fällen nahm die BetP-Aktivität bei einer hohen internen K^+ -Konzentration in Anwesenheit von TC leicht ab. Bei niedrigem internen K^+ -Gehalt stieg die Betainimportrate relativ gering an, wobei diese Steigung in Zellen stärker war (3,1-fach) als in Vesikeln (1,4-fach). Es fällt allerdings auf, dass die Grundaktivität von BetP in Proteoliposomen mit ca. 27 % der Maximalaktivität signifikant höher war als die in Zellen (ca. 9 % der Maximalaktivität). Dieser Unterschied lässt sich wahrscheinlich auf die unterschiedliche interne K^+ -Konzentration und Lipidzusammensetzung der Membran von *C. glutamicum*-Zellen und Proteoliposomen zurückführen. Zusammengefasst deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der alternative, K^+ -unabhängige BetP-Stimulus in Proteoliposomen wirksam ist und von BetP perzipiert wird.

3.3 Charakterisierung des Aktivierungszustands von BetP in intakten Zellen und in Proteoliposomen

Die Untersuchung der BetP-Aktivierung in *C. glutamicum*-Zellen demonstrierte, dass der Transporter zwei unterschiedliche Stimuli wahrnehmen kann: den K^+ -assoziierten und den K^+ -unabhängigen Stimulus, welcher bei hyperosmotischem Schock auftritt. Keine der beiden Stimuli allein ist in der Lage, BetP vollständig zu aktivieren. Die höchste Betainimportrate wird erst bei einer hohen intrazellulären K^+ -Konzentration unter hochosmotischen Bedingungen erreicht, also nur wenn beide Stimuli gleichzeitig präsent sind. Die Tatsache, dass die Steigerung der K^+ -Konzentration im Proteoliposomenlumen als einzelner, BetP aktivierender Parameter identifiziert wurde (Rübenhagen, 2001; Schiller *et al.*, 2004), wirft die Frage nach dem Aktivierungszustand des Transporters *in vitro* auf. Die Untersuchung der TC-bedingten BetP-Aktivierung lieferte einen Hinweis darauf, dass der alternative BetP-Stimulus in Vesikeln wahrscheinlich aktiv ist. Da das Problem der BetP-Aktivierung in artifiziellem System für das Verständnis der BetP-Regulation von Bedeutung ist, sollte dies mit einer alternativen Methode untersucht werden. Um den Aktivierungszustand von BetP *in vitro* zu ermitteln, muss die BetP-Aktivität in Zellen und in Proteoliposomen verglichen werden. Allerdings kann die Betainimportrate in diesen zwei Systemen nicht direkt gegenübergestellt werden, da die Betainaufnahme in lebenden Zellen auf die ZTM und in Vesikeln auf die Proteinmasse bezogen wird. Der einzige Parameter, der für beide Testsysteme universell und somit vergleichbar ist, ist die molekulare Aktivität bzw. die

Ergebnisse

Wechselzahl von BetP. Die molekulare Aktivität gibt an, wie viele Substratmoleküle pro Transporter pro Minute bei V_{\max} transloziert werden, und hat die Dimension von min^{-1} . Um die molekulare BetP-Aktivität zu ermitteln, werden drei Parameter benötigt: die Betainimportrate (i), die BetP-Konzentration (ii) und der Anteil aktiver BetP-Moleküle (iii). Diese drei Parameter wurden in Zellen und in Proteoliposomen bestimmt und der Aktivierungszustand von BetP *in vivo* und *in vitro* verglichen.

3.3.1 Bestimmung der molekularen Aktivität von BetP in *E. coli* MKH13 (pBetP)-Zellen

Von den drei Parametern, die für die Berechnung der molekularen Aktivität von BetP erforderlich sind, ist die Betainimportrate am einfachsten zu bestimmen, da Betainimportmessungen sowohl in Zellen als auch in Proteoliposomen eine Routinemethode in unserem Labor darstellen. Der quantitative Nachweis von BetP in Zellen wurde dagegen bisher nicht durchgeführt und musste neu etabliert werden. Die BetP-Konzentration wurde in Zellextrakten von *E. coli* MKH13 (pBetP) immunologisch bestimmt. *E. coli*-Zellen wurden aus folgenden Gründen gewählt. Die Ermittlung der molekularen Aktivität von rekonstituiertem BetP erfolgte in Proteoliposomen aus *E. coli*-Lipiden und es ist sinnvoll, die analogen Messungen *in vivo* bei ähnlicher Membranzusammensetzung durchzuführen. Außerdem ist der Zellaufschluss und die Proteinextraktion von Gram-negativem *E. coli* einfacher als die von Gram-positivem *C. glutamicum* mit einer stabileren, Mykolat-haltigen Zellwand.

Wie bereits erwähnt, muss auch der Anteil der aktiven BetP-Moleküle für die Bestimmung der molekularen BetP-Aktivität bekannt sein. Da die molekulare Aktivität eines Proteins auf dessen Menge bezogen wird, würde ein hoher Anteil inaktiver Proteinmoleküle zur Unterbestimmung des Wertes führen. Um Missverständnisse zu vermeiden, muss erwähnt werden, dass der tatsächliche Anteil von inaktivem BetP, das in Zellen synthetisiert wird, nicht ermittelt werden kann. Es ist hypothetisch möglich, dass es in *E. coli* immer einen Grundanteil nicht funktioneller BetP-Moleküle gibt, der nicht identifiziert werden kann. Dieser Grundanteil ist allerdings für die Bestimmung der molekularen BetP-Aktivität nicht kritisch, da für die Rekonstitution verwendetes BetP ebenfalls in *E. coli* synthetisiert wird. Somit wäre der Fehler *in vivo* und *in vitro* vergleichbar groß. Ein anderes Problem könnte

Ergebnisse

jedoch die Bestimmung der molekularen Aktivität von BetP signifikant beeinflussen. BetP wird in *E. coli* von einem Plasmid massiv überexprimiert. Bei längeren Expressionszeiten könnte die Akkumulation großer BetP-Mengen in der Plasmamembran zum Aggregieren und zum Funktionsverlust eines BetP-Anteils führen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die molekulare BetP-Aktivität bei unterschiedlicher Überexpressiondauer bestimmt. Die Abnahme der molekularen Aktivität von BetP im Laufe der Expressionszeit würde auf die Anhäufung inaktiver Transportermoleküle deuten.

BetP wurde in *E. coli* MKH13 (pBetP)-Zellen überexprimiert. Nach der Induktion der BetP-Transkription wurde die Betainimportrate zu den Zeitpunkten von 15 - 180 min bestimmt (Abbildung 3.20). Die Messung wurde bei einer externen Osmolalität von 0,9 osmol/kg durchgeführt, bei welcher die höchste BetP-Aktivität festgestellt wurde.

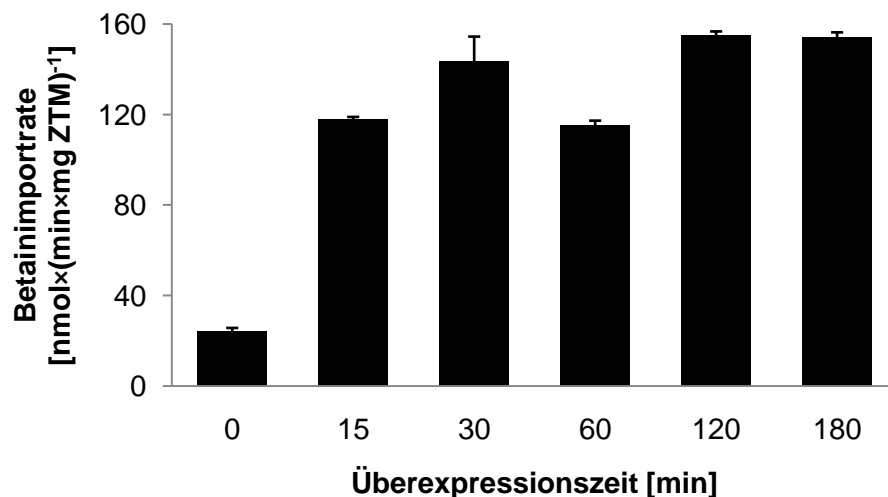


Abbildung 3.20: BetP-Transportaktivität in *E. coli* MKH13 (pBetP)-Zellen in Abhängigkeit der Überexpressionszeit. Die Zellen wurden vor der Betainzugabe 3 min bei 30 °C inkubiert. Externer Puffer: 25 mM NaPi, 0,1 M NaCl, pH 8; die Osmolalität des externen Puffers wurde mit NaCl auf 0,9 osmol/kg eingestellt. Die Transportmessung wurde durch die Zugabe von 0,25 mM radioaktiv markiertem Betain gestartet und 90 s lang verfolgt. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei Messungen mit Standardabweichungen.

Bereits 15 min nach Induktion der *betP*-Transkription wurde eine Betainimportrate von $118 \pm 1 \text{ nmol} \times (\text{min} \times \text{mg ZTM})^{-1}$ gemessen, die ca. 76 % der maximalen BetP-Aktivität entsprach. Die maximale Transportrate von $155 \pm 2 \text{ nmol} \times (\text{min} \times \text{mg ZTM})^{-1}$ wurde 2 h nach dem Überexpressionsstart festgestellt.

Ergebnisse

Anschließend wurde der Betain-Gehalt in den Zellen, die für die Betainimportmessung verwendet wurden, bestimmt. Normalerweise wird für den Nachweis von BetP der Western Blot eingesetzt. Für die genaue Quantifizierung des Transporters ist die standardmäßige Variante dieser Methode jedoch nicht gut geeignet. Bei der elektrischen Übertragung der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran bleibt immer ein unbekannter Proteinanteil im Gel übrig. Um diesen Verlust zu vermeiden, wurde das präparierte Zellmaterial direkt auf eine NC-Membran aufgetragen (Dot Blot). Die Zellen wurden mechanisch mithilfe von Glasperlen aufgeschlossen. Da BetP ein Membranprotein ist, wurde das Zellhomogenisat mit 0,5 % Lauroylsarcosin solubilisiert und zentrifugiert und BetP wurde im Überstand immunologisch quantifiziert. Das Sediment mit nicht solubilierten Partikeln enthielt ca. 3 % des Gesamtproteins, weshalb man von einem erschöpfenden Zellaufschluss und einer effizienten Proteinextraktion ausgehen kann. Für den BetP-Nachweis wurden anti-Strep-Antikörper verwendet, weil der für diese Arbeit verwendete Transporter einen N-terminalen StrepII-Tag trug. Der sekundäre anti-Maus-Antikörper war mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert. Für die Quantifizierung von an die Membran gebundenem BetP wurde das wasserlösliche Substrat para-Nitrophenylphosphat (pNPP) verwendet, das durch die AP zu ebenfalls wasserlöslichem, gelbem para-Nitrophenol (pNP) umgesetzt wird. Das letztere hat ein Absorptionsmaximum im Bereich von 400-410 nm. Die Menge von pro eine definierte Zeiteinheit gebildetem pNP ist der AP-Menge und somit der BetP-Menge in der Probe proportional. Für die Kalibrierung wurde isoliertes BetP eingesetzt. Dieses wurde mit dem Zellextrakt von *E. coli* MKH13, das wie die Zellextrakte von *E. coli* MKH13 (pBetP) präpariert wurde, gemischt. Die BetP-haltigen Membranfragmente wurden im pNPP-haltigen Puffer 3 h lang inkubiert und die Absorption bei 406 nm bestimmt. Eine typische Kalibrierungsreihe ist in Abbildung 3.21 dargestellt. Man muss erwähnen, dass die absoluten A_{406} -Werte sich bei zwei unabhängigen Bestimmungen unterscheiden können. Die unterschiedlichen absoluten Werte stören jedoch die Bestimmung der BetP-Konzentration nicht, weil dieser Unterschied für alle Proben des jeweiligen Reaktionsansatzes gilt. Die Berechnung der BetP-Mengen in den Zellextraktproben führten zu ähnlichen Ergebnissen. Der BetP-Gehalt in den Zellextrakten wurde bestimmt und ist in Tabelle 3.2 dargestellt.

Ergebnisse

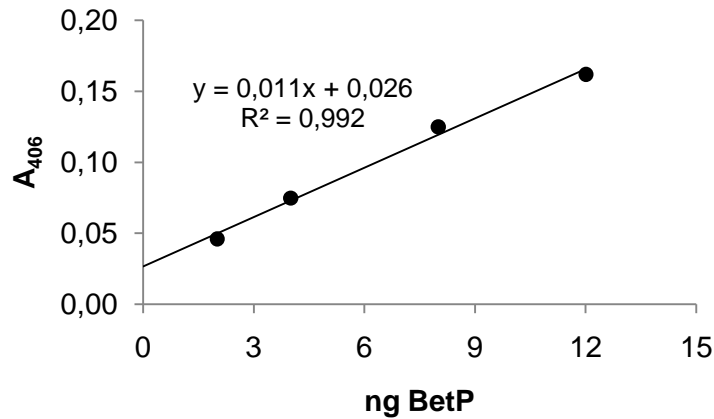


Abbildung 3.21: Kalibrierungsreihe für die immunologische BetP-Bestimmung mithilfe der monoklonalen anti-Strep-Antikörper. Die Membranfragmente mit BetP-Proben wurden 3 h mit pNPP-haltigen Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Absorption von gebildetem pNP bei 406 nm gemessen und gegen die BetP-Masse in den Proben aufgetragen.

Tabelle 3.2: BetP-Gehalt in Zellextrakten von *E. coli* MKH13 (pBetP) nach unterschiedlicher Überexpressionsdauer. BetP wurde mithilfe monoklonaler anti-Strep-Antikörper detektiert. Dargestellt sind Mittelwerte von zwei unabhängigen Messungen.

Expressionsdauer [min]	µg BetP / mg ZTM
15	2,2
30	3,0
60	2,4
120	1,6
180	0,8

Der Anstieg des BetP-Gehalts in Zellextrakten von *E. coli* MKH13 (pBetP) innerhalb der ersten 30 min und die anschließende Verringerung nach 60 min nach der Expressionsinduktion korrelierte mit dem Verlauf der Betainimportrate innerhalb der ersten Stunde nach der Transkriptionsinduktion. Allerdings wurde nach 120 und 180 min trotz des Erreichens der maximalen Betainimportrate eine sukzessive Abnahme der detektierten BetP-Menge beobachtet. Die Abnahme der BetP-Konzentration in den Zellen bei konstanter Betainimportrate erschien nicht plausibel. Es wurde vermutet, dass der StrepII-Tag, der als Epitop für den primären Antikörper fungiert, bei längerer Überexpression degradiert werden könnte, wodurch ein bestimmter BetP-Anteil nicht detektierbar wäre. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde BetP in den Zellextrakten mithilfe der polyklonalen anti-BetP-Antikörper

Ergebnisse

nachgewiesen. Die Kalibrierung der Messung mit dem anti-BetP-Antikörper erfolgte vergleichbar gut wie mit dem anti-Strep-Antikörper (Abbildung 3.22), und der ermittelte BetP-Gehalt (Tabelle 3.3) unterschied sich nur geringfügig von dem, der mithilfe der anti-Strep-Antikörper gemessen wurde. Bei der BetP-Quantifizierung mit dem anti-BetP-Antikörper wurde ebenfalls eine Abnahme des BetP-Gehalts in Zellextrakten nach 2 und 3 h Überexpression festgestellt.

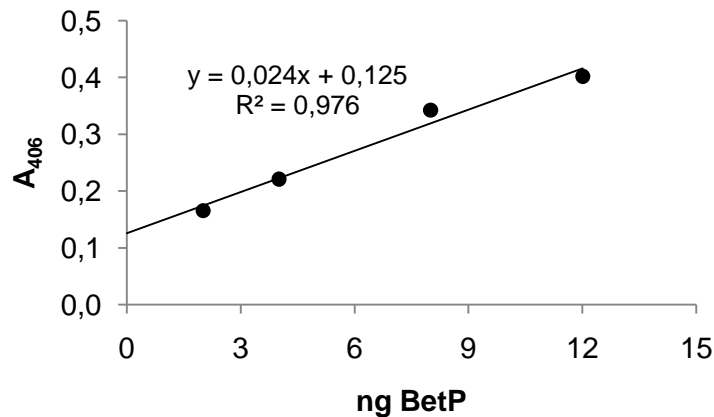


Abbildung 3.22: Kalibrierungsreihe für die immunologische BetP-Bestimmung. Der BetP-Nachweis erfolgte mit polyklonalen anti-BetP-Antikörpern. Die Membranfragmente mit BetP-Proben wurden 3 h mit pNPP-haltigen Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Absorption von gebildetem pNP bei 406 nm gemessen und gegen die BetP-Masse in den Proben aufgetragen.

Tabelle 3.3: BetP-Gehalt in Zellextrakten von *E. coli* MKH13 (pBetP)-Zellen nach unterschiedlicher Überexpressionsdauer. BetP wurde mithilfe polyklonaler anti-BetP-Antikörper detektiert.

Expression [min]	µg BetP / mg ZTM
15	2,2
30	2,6
60	2,1
120	1,5
180	1,3

Da die Bestimmung des BetP-Gehalts in Zellextrakten mithilfe der beiden Antikörper ähnliche Werte lieferte, wurden sie zusammengefasst und für die Berechnung der

Ergebnisse

molekularen Aktivität von BetP in *E. coli* MKH13 (pBetP)-Zellen nach unterschiedlicher Überexpressionsdauer verwendet (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Molekulare Aktivität von BetP in *E. coli* MKH13 (pBetP)-Zellen in Abhängigkeit der Überexpressionszeit. Für die Berechnung der Aktivität wurde der mithilfe der anti-Strep-Antikörper und anti-BetP-Antikörper bestimmte BetP-Gehalt eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte von jeweils drei Messungen mit Standardabweichungen.

Expressionsdauer [min]	Molekulare BetP-Aktivität [min ⁻¹]
15	3486 ± 325
30	3264 ± 378
60	3234 ± 310

Da es für die Abnahme des BetP-Gehalts in Zellen bei konstanter Betainimportrate keine plausible Erklärung gibt, ist sie wahrscheinlich auf ein Artefakt zurückzuführen. Aus diesem Grund wurde die Wechselzahl von BetP nur innerhalb der ersten Stunde nach Induktion der *betP*-Transkription berechnet. Die Wechselzahl von BetP in *E. coli* MKH13 (pBetP)-Zellen war innerhalb einer Stunde nach der Induktion der Transkription konstant und betrug ca. $3300 \pm 350 \text{ min}^{-1}$.

3.3.1 Bestimmung der molekularen Aktivität von BetP in Proteoliposomen

Um den Aktivierungszustand von BetP in Proteoliposomen zu bestimmen, muss zuerst die molekulare Aktivität des rekonstituierten Transporters ermittelt werden. Wie bereits erwähnt, sind dafür drei Parameter erforderlich: die Betainimportrate, die BetP-Konzentration im Messsystem und der Anteil der aktiven BetP-Moleküle. Die Messung der Betainaufnahme in Proteoliposomen ist eine Routinemethode, die ohne großen Aufwand durchgeführt werden kann. Die Bestimmung des BetP-Gehalts in Vesikeln ist erheblich einfacher als in Zellen. Da für die Rekonstitution gereinigtes BetP verwendet wird (Abbildung 3.23) und die residuale Proteinmenge im polaren Lipidextrakt von *E. coli*, das für die Herstellung der Liposomen eingesetzt wird, vernachlässigbar klein ist, kann man die Proteinkonzentration in Proteoliposomen der BetP-Konzentration gleichsetzen.

Ergebnisse

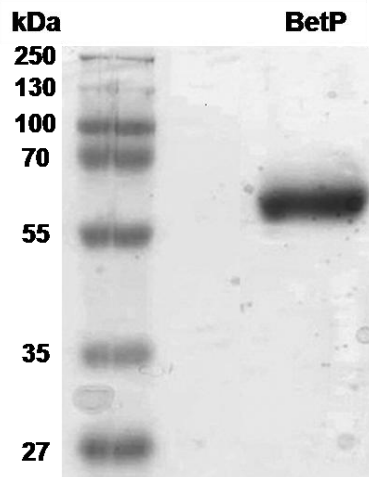


Abbildung 3.23: SDS-PAGE mit gereinigtem StrepII-BetP C252T.

Die Bestimmung des Anteils von aktivem BetP in Vesikeln, stellt jedoch eine Herausforderung dar. Derartige Versuche für rekonstituierte Transportsysteme wurden bisher nur selten beschrieben (Krämer und Klingenberg, 1979), obwohl sie für die korrekte Berechnung der molekularen Aktivität des Proteins essenziell sind. Ein Membrantransporter in einer artifiziellen Phospholipiddoppelschicht wurde bei der Solubilisierung mit Detergenzien, Reinigung und Reintegration in eine neue Membran zahlreichen Änderungen seiner Umgebung ausgesetzt. Dies kann zur Inaktivierung eines Anteils der Transportermoleküle führen, der allerdings nur schwer abgeschätzt werden kann.

Die Menge eines aktiven Proteins kann durch die Titration mit einem markierten hochaffinen Inhibitor für dieses Protein ermittelt werden. Die Bestimmung der Menge des gebundenen Inhibitors erlaubt einen Rückschluss auf die Menge des aktiven Transporters (Krämer und Klingenberg, 1979, 1977). So ein Inhibitor für BetP ist jedoch nicht bekannt, deshalb wurde eine alternative Methode zur Bestimmung des Anteils aktiver BetP-Moleküle in Proteoliposomen entwickelt, die im Folgenden am Beispiel eines idealisierten, virtuellen Systems erklärt wird. In diesem Modell wird ein beliebiger Transporter in Liposomen bei unterschiedlichem Protein/Lipid-Verhältnis (PLV) rekonstituiert. Ein Teil der Transportermoleküle verliert im Laufe der Rekonstitution seine Funktionalität. Bei sehr geringen PLV-Werten würde nur eine kleine Anzahl der Liposomen mit dem Transporter beladen werden. Dabei wäre jedoch die Wahrscheinlichkeit, dass ein Proteoliposom mehr als ein einzelnes aktives Transportermolekül inkorporiert, vernachlässigbar. Nach der Rekonstitution wird die Substratakkumulation in den Proteoliposomen bis zur Sättigung

Ergebnisse

gemessen, bis kein Netto-Betainimport mehr stattfindet. Es muss betont werden, dass dabei nicht die Transportgeschwindigkeit, sondern die gesamte akkumulierte Substratmenge detektiert wird. Wenn beispielsweise 1 % der Liposomen mit Protein beladen ist und ein Anteil davon einen einzelnen aktiven Transporter trägt, wird insgesamt die Substratmenge x akkumuliert. Verdoppelt man das PLV, sollte sich auch die Anzahl der mit dem aktiven Transporter beladenen Vesikeln verdoppeln, sowie die Menge des akkumulierten Substrats auf $2x$ erhöhen. Dieser lineare Zusammenhang zwischen der PLV und der akkumulierten Substratmenge gilt bis zu dem Punkt, an dem alle Liposomen einen aktiven Transporter tragen (Sättigungspunkt). Danach führt die PLV-Steigerung zu keiner Erhöhung der akkumulierten Substratmenge mehr, diese wird lediglich schneller erreicht. Wird die aufgenommene Substratmenge graphisch gegen das PLV aufgetragen, so muss der Graph idealerweise einen Bereich mit linearer Steigung, die gegen Null läuft, sowie einen Bereich, in dem keine Steigung mehr stattfindet, aufweisen. Extrapoliert man diese zwei Bereiche, so schneiden sich die beiden Geraden in einem Punkt. Die Abszissen-Koordinate dieses Sättigungspunkts zeigt das PLV, bei dem jedes Proteoliposom **einen** aktiven Transporter inkorporiert. Dieses wird im Folgenden als Sättigungs-PLV (PLV_{sat}) bezeichnet.

Es gibt jedoch zwei Voraussetzungen für die Anwendung der vorgeführten Methode. Die Proteoliposomen müssen bei unterschiedlichem PLV eine ähnliche Größe haben und die BetP-Aktivität in diesen Vesikeln muss vergleichbar hoch sein. Diese Parameter wurden überprüft. Es wurden BetP-Proteoliposomen mit einem relativ hohen PLV von 33,3 mg/g präpariert. Durch das Fusionieren dieser Vesikel mit unterschiedlichen Lipidmengen wurde das PLV sukzessive bis auf 4,2 mg/g herabgesetzt. Die Größe der hergestellten Vesikel wurde mithilfe der dynamischen Lichtstreuung (DLS) gemessen (Abbildung 3.24). Im PLV-Bereich von 4,2-25 mg/g hatten die Proteoliposomen eine konstante durchschnittliche Größe von $126,9 \pm 3,7$ nm. Anschließend wurde die BetP-Aktivität in den Proteoliposomen verglichen (Abbildung 3.25). Im Gegensatz zu den Standardmessungen der Betainaufnahme wurde das akkumulierte Betain 10 s nach dem Reaktionsstart quantifiziert und auf die Proteinmasse normalisiert. Da die Betainaufnahme innerhalb der ersten 10 s annähernd linear verläuft, ist diese Methode zum Vergleich der spezifischen Aktivität von BetP in unterschiedlichen Proteoliposomenpräparaten geeignet.

Ergebnisse

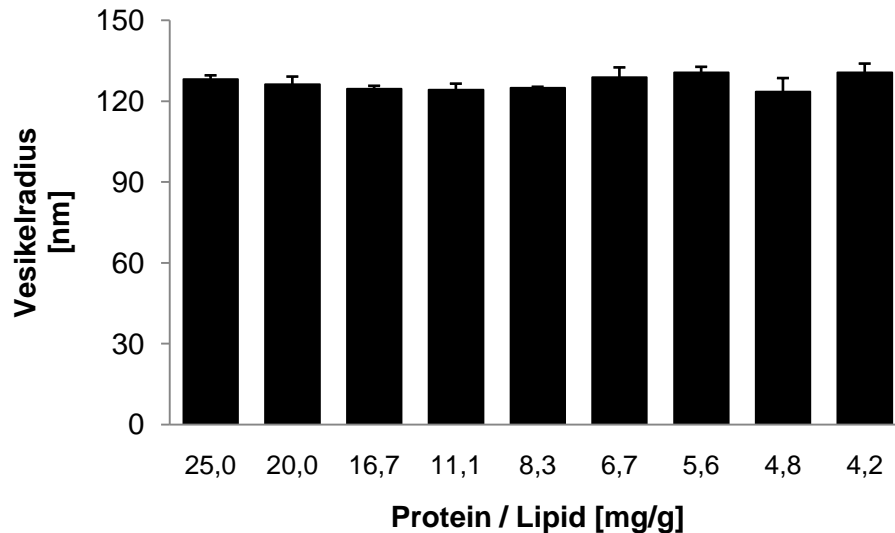


Abbildung 3.24: Durchschnittlicher Radius der Proteoliposomen bei unterschiedlichem PLV. Die Vesikelgröße wurde mithilfe der dynamischen Lichtstreuung gemessen. Externer und interner Puffer: 0,1 M KPi, pH 7,5. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei Messungen mit Standardabweichungen.

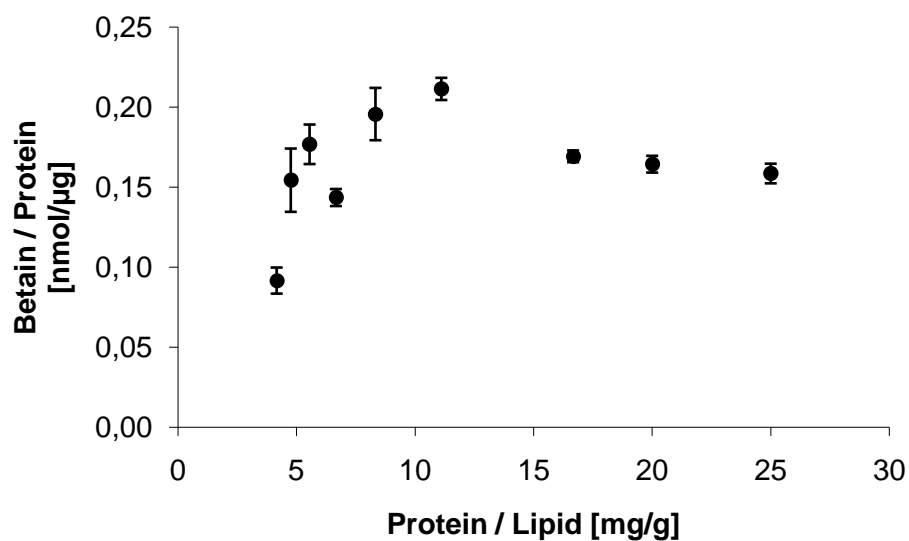


Abbildung 3.25: Vergleich der BetP-Transportaktivität in Proteoliposomen mit unterschiedlichem PLV. Die akkumulierte Betainmenge wurde 10 s nach dem Reaktionsbeginn gemessen. Interner Puffer: 0,1 M KPi, pH 7,5; externer Puffer: 20 mM NaCl, 25 mM NaPi pH 7,5, die externe Osmolalität wurde auf 0,6 osmol/kg mit Sorbit eingestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils fünf Messungen mit Standardabweichungen mit Standardabweichungen.

Verglichen mit der Vesikelgröße im PLV-Bereich von 4,2 - 25 mg/g wies die initiale Betainakkumulation in Proteoliposomen im gleichen PLV-Bereich eine stärkere Streuung auf: der Mittelwert lag bei 166 ± 27 nmol Betain/µg Protein. Allerdings ist die Standardabweichung von ca. 16 % bei den Transportmessungen in Proteoliposomen

Ergebnisse

tolerierbar. Man kann deshalb annehmen, dass die BetP-Aktivität *in vitro* bei unterschiedlichem PLV vergleichbar hoch ist. Anschließend wurde die langzeitige Betainakkumulation gemessen. Das aufgenommene Betain wurde 3 min nach dem Messungsbeginn quantifiziert, da die Vesikel zu diesem Zeitpunkt mit dem Substrat gesättigt waren. Die Ergebnisse der Betainakkumulation sind in Abbildung 3.26 dargestellt.

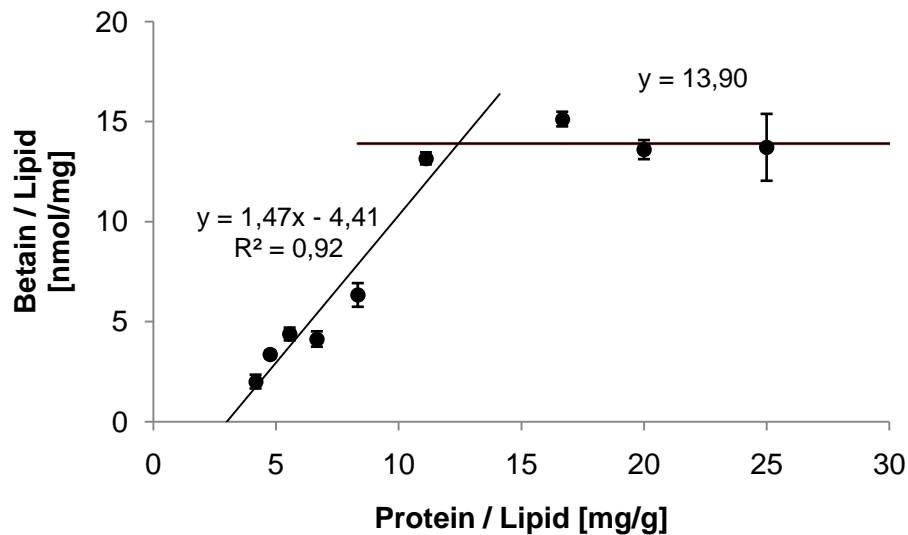


Abbildung 3.26: Betainakkumulation in Proteoliposomen mit unterschiedlichem PLV. Der interne Betaingehalt wurde nach dem Einstellen des Gleichgewichts, 3 min nach dem Messungsbeginn, gemessen. Interner Puffer: 0,1 M KPi, pH 7,5; externer Puffer: 20 mM NaCl, 25 mM NaPi pH 7,5, die externe Osmolalität wurde auf 0,6 osmol/kg mit Sorbit eingestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils fünf Messungen mit Standardabweichungen.

Die akkumulierte Betainmenge stieg im PLV-Bereich von 4,2 - 11,1 mg/g annähernd linear an. Ab einem PLV von 16,7 mg/g änderten sich die Werte nicht mehr signifikant. Es wurde daher angenommen, dass das PLV_{sat} zwischen 11,1 - 16,7 mg/g liegt. Um diesen genauer zu kalkulieren, wurde zuerst eine Regressionsgerade für den steigenden Graphenabschnitt konstruiert und die Formel dieser Gerade ermittelt:

$$f(x) = 1,47x - 4,41 \quad f(x): \text{akkumuliertes Betain [nmol/mg Lipid]}; x: \text{PLV [mg/g]},$$

Die maximale akkumulierte Betainmenge betrug $13,9 \pm 0,9$ nmol/mg Lipid (Ordinatenwert der roten Gerade, die parallel zur Abszissenachse verläuft) und wird bei einem PLV von $12,5 \pm 0,6$ mg/g erreicht. Somit liegt das PLV_{sat} , bei welchem jedes Proteoliposom einen einzelnen Transporter trägt, bei $1:80 \pm 4$. Nachdem das PLV_{sat} ermittelt wurde, konnte der

Ergebnisse

Anteil aktiver BetP-Moleküle in Proteoliposomen berechnet werden. Dafür muss das Massenverhältnis eines BetP-Trimers zum Proteoliposom bekannt sein. Zuerst wurde die Fläche eines Liposoms berechnet. Da man ein Proteoliposom (Abkürzung: Proli) als einen sphärischen Körper beschreiben kann, gilt:

$$A_{Proli} = 4\pi r^2 = 4\pi \times 126,9^2 \text{ nm} = 202677 \text{ nm}^2$$

Danach wurde berechnet, wie viele Phospholipide (Abkürzung: PL) für die Bildung eines Proteoliposoms mit einer solchen Fläche benötigt werden. Ein einzelnes Phospholipid an der Grenzfläche einer Lipidschicht hat eine durchschnittliche Fläche von 0,6-0,7 nm². Diese Werte wurden für PG, PE (typische Lipide aus der Plasmamembran von *E. coli*) oder PC, welches in eukaryotischen Membranen häufig vorkommt, berechnet (Hénin *et al.*, 2009; Marsh, 1990; Petrache *et al.*, 2000). Für die weiteren Berechnungen wird ein Wert von 0,65 nm² eingesetzt. Da Phospholipide eine Doppelschicht im wässrigen Medium bilden, gilt:

$$n(PL/Proli) = (202667 \text{ nm}^2 / 0,65 \text{ nm}^2) \times 2 = 623622$$

Die gemessene durchschnittliche molare Lipidmasse im polaren Lipidextrakt von *E. coli*, welches für die Herstellung der Liposomen verwendet wird, beträgt 816 g/mol.

$$M(Proli) = 623622 \times 816 \text{ g/mol} = 5,088 \times 10^8 \text{ g/mol}$$

Die molare Masse eines BetP-Trimers beträgt 192627 g/mol. Somit würde ein hypothetisches Proteoliposom mit dem Radius von 126,9 nm, das ein einzelnes BetP-Trimer beinhaltet, ein PLV von 1:2641 aufweisen. Laut der experimentellen Bestimmung, liegt das PLV_{sat} jedoch bei 1:80. Teilt man 2641 durch 80, erhält man einen Wert von ~33 BetP-Trimeren pro Proteoliposom. Damit ist theoretisch 1 Protein aus 33 in einem Proteoliposom aktiv. Dies entspricht ca. 3 % aktivem BetP in Proteoliposomen. Anschließend wurde die molekulare Aktivität von BetP in Proteoliposomen kalkuliert. Die maximale gemessene Aktivität von BetP in Proteoliposomen betrug $1133 \pm 277 \text{ nmol} \times (\text{min} \times \text{mg Protein})^{-1}$. In einem mg BetP sind 15,6 nmol des Proteins enthalten. Auf ein BetP-Molekül bezogen, entspricht diese Aufnahmerate der Wechselzahl von $73 \pm 14 \text{ min}^{-1}$. Unter Annahme, dass nur 3 % der BetP-Moleküle aktiv sind, beträgt die molekulare Aktivität von BetP in Proteoliposomen $2433 \pm 466 \text{ min}^{-1}$.

Ergebnisse

Die berechnete molekulare Aktivität von BetP in *E. coli*-Zellen bei vollständiger Aktivierung beträgt $3300 \pm 350 \text{ min}^{-1}$. Dieser Wert liegt nah am Wert, der für BetP *in vitro* ermittelt wurde. Diese Tatsache weist darauf hin, dass BetP in Proteoliposomen einen ähnlichen Aktivierungszustand hat wie BetP in Zellen, das sowohl dem K^+ -assoziierten als auch dem K^+ -unabhängigen Stimulus ausgesetzt ist.

3.4 Untersuchung der K^+ -Bindung an BetP

3.4.1 Untersuchung der K^+ -Bindung an BetP in *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen

Die Rolle der steigenden K^+ -Konzentration im Zytoplasma bzw. im Proteoliposomenlumen bei der Aktivierung von BetP wurde bereits oft erwähnt. Allerdings ist die Perzeption des K^+ -assoziierten Stimulus durch BetP nicht im Detail verstanden. Es ist bekannt, dass die C-terminale Extension von BetP in die Wahrnehmung des K^+ -abhängigen Stimulus involviert ist (s. Abschnitt 1.4). Zur Zeit der Untersuchungen des K^+ -assoziierten Stimulus von BetP konnte jedoch keine direkte Interaktion des Transporters mit K^+ demonstriert werden. Dies änderte sich nach den Experimenten unseres Kooperationspartners Camilo Perez (MPI für Biophysik Frankfurt, AG Dr. Christine Ziegler). Dabei wurden BetP-Kristalle, die ursprünglich im K^+ -haltigen Puffer hergestellt wurden, mit unterschiedlicher RbCl-Konzentration inkubiert und anschließend untersucht. Bereits bei 10 mM Rb^+ wurden im BetP-Trimer mehrere gebundene Ionen nachgewiesen. Bei zwei Interaktionen handelte es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um spezifische Bindungen. Die Anzahl der an BetP spezifisch gebundenen Rb^+ nahm mit steigender RbCl-Konzentration (300 mM) bis auf fünf zu. Die C-Domänen der benachbarten Protomere und der zytoplasmatische Loop 2 von BetP sind an der Koordination einiger gebundener Rb^+ beteiligt (persönliche Mitteilung: Camilo Perez). BetP lässt sich in Proteoliposomen und in *C. glutamicum*-Zellen auch durch die Erhöhung der internen Rb^+ -Konzentration aktivieren (Ott, 2008; Rübenhagen *et al.*, 2001). Die hohe Anzahl der putativen Bindestellen für Rb^+ warf die Frage auf, ob die Rb^+ - bzw. K^+ -Bindung an BetP kooperativ oder nicht kooperativ erfolgt.

Die kooperative Bindung eines Liganden an ein Protein (z. B. Transporter oder Enzym) setzt die Anwesenheit von mehreren Bindestellen voraus. Bei einer kooperativen Bindung erleichtert die Bindung eines Ligandenmoleküls die Bindung weiterer Ligandenmoleküle. Da

Ergebnisse

BetP Homotrimer bildet und jede Untereinheit theoretisch mindestens ein K^+ binden kann, wäre eine kooperative Bindung von K^+ an das BetP-Trimer möglich. Eine kooperative Bindung eines Liganden an ein Protein kann man mit Hilfe einer graphischen Auftragung der Proteinaktivität (z. B. Transport- bzw. Reaktionsgeschwindigkeit) in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration erkennen. Liegt eine Kooperativität vor, hat die Aktivitätskurve einen sigmoiden Verlauf. Diese Aktivitätskurve kann mit Hilfe der doppellogarithmischen Hill-Auftragung linearisiert werden, was die Bestimmung der Ligandenkonzentration bei halbmaximaler Aktivität ($K_{1/2}$) erleichtert und die Abschätzung der Bindestellenzahl ermöglicht. Bei einer Hill-Auftragung wird $\log(v/(V_{max}-v))$ gegen $\log([Ligand])$ aufgetragen. Dabei sind v die Aktivität und V_{max} die maximale Aktivität des Proteins. Die Steigung des Graphen ist gleich dem Hill-Koeffizienten (n_H). Bei einem n_H von 1 liegt keine Kooperativität vor, d.h. die Bindung einzelner Liganden erfolgt unabhängig voneinander. Ein n_H -Wert von >1 deutet auf das Vorhandensein kooperativer Bindungsstellen hin: je größer der n_H , desto höher die Kooperativität. Es muss jedoch erwähnt werden, dass der n_H -Wert immer niedriger als die reale Anzahl der Bindestellen ist. Der $K_{1/2}$ -Wert lässt sich wie folgt ermitteln: bei $v = 1/2 V_{max}$ ist der Term $\log(v/V_{max}-v)$, also der y-Wert gleich Null. Somit lässt sich die $K_{1/2}$ aus dem $\log([Ligand])$ -Wert bei $y = 0$ berechnen:

$$K_{1/2} = 10^{(\log[Ligand] \text{ bei } y = 0)}$$

Um zu überprüfen, ob die K^+ -Bindung an BetP einen kooperativen Charakter hat, musste getestet werden, ob die BetP-Aktivität in Abhängigkeit der intrazellulären K^+ -Konzentration einen sigmoiden Verlauf zeigt. Daher wurde zuerst überprüft, ob die stufenweise Erhöhung der intrazellulären K^+ -Konzentration in *C. glutamicum* möglich ist. K^+ -verarmte *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen wurden 10 min lang bei externen KCl-Konzentrationen von 70 μ M - 2,5 mM inkubiert. Die externe Osmolalität betrug 0,24 osmol/kg. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und die intrazelluläre K^+ -Konzentration mithilfe von AES ermittelt (Abbildung 3.27). Im Bereich der externen K^+ -Konzentration von 0-1 mM nahm die intrazelluläre K^+ -Konzentration annähernd linear von 20-350 mM zu. Anschließend verlangsamte sich die K^+ -Aufnahme und der intrazelluläre K^+ -Gehalt stagnierte bei ca. 400 mM bei einer externen KCl-Konzentration von $\geq 1,75$ mM.

Ergebnisse

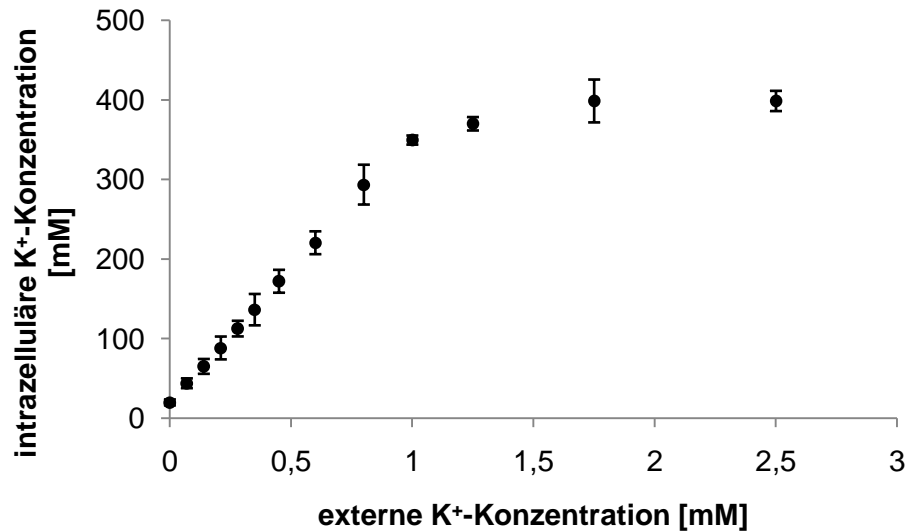


Abbildung 3.27: Variation des zytoplasmatischen K⁺-Gehalts in *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen durch die Inkubation der Zellen bei unterschiedlichen externen K⁺-Konzentrationen. Externer Puffer: 25 mM NaPi, 0,1 M NaCl, pH 8, 0,24 osmol/kg. Die Zellen wurden 10 min bei 30 °C bei 70, 140, 210, 280, 350, 450, 600, 800, 1000, 1250, 1750 und 2500 μ M KCl inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die zytoplasmatische K⁺-Konzentration wurde mittels AES quantifiziert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von neun Messungen mit Standardabweichungen.

Nach dem das Protokoll für das Variieren der intrazellulären K⁺-Konzentration in *C. glutamicum* etabliert wurde, wurde die Betainimportmessung bei unterschiedlichem internem K⁺-Gehalt gemessen. Die Zellen wurden bei der externen Osmolalität von 0,24 osmol/kg 10 min lang mit 70 μ M - 2,5 mM KCl inkubiert. Anschließend wurde die Transportmessung durch die Zugabe von 0,25 mM [¹⁴C]-Betain gestartet. Der Betainimport wurde 1,5 min lang verfolgt. Die niedrige externe Osmolalität wurde eingestellt, um die zusätzliche BetP-Aktivierung durch den K⁺-unabhängigen Stimulus zu vermeiden. Die Ergebnisse der Transportmessung sind Abbildung 3.28 zu entnehmen.

Ergebnisse

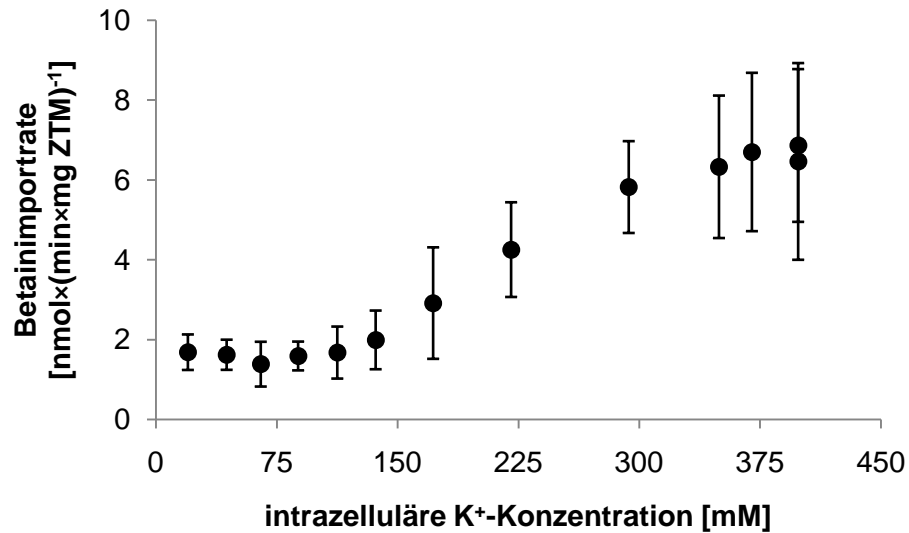


Abbildung 3.28: Betainimportrate in *C. glutamicum* DHPF(pBetP)-Zellen in Abhängigkeit der intrazellulären K⁺-Konzentration. Externer Puffer: 25 mM NaPi, 0,1 M NaCl, pH 8, 0,24 osmol/kg. Die Zellen wurden vor der Betainzugabe 10 min bei 30 °C bei 70, 140, 210, 280, 350, 450, 600, 800, 1000, 1250, 1750 und 2500 μ M inkubiert. Die Transportmessung wurde durch die Zugabe von 0,25 mM radioaktiv markierten Betain gestartet und 90 s lang verfolgt. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils mind. vier Messungen mit Standardabweichungen.

Die gegen die intrazelluläre K⁺-Konzentration aufgetragene BetP-Aktivität ergab eine sigmoide Kurve. Bei einem internen K⁺-Gehalt von ≤ 113 mM änderte sich die Betainimportrate nicht signifikant, bei ca. 370 mM K⁺ erreichte der Transporter die maximale Aufnahme rate von $6,7 \pm 1,95$ $\text{nmol} \times (\text{min} \times \text{mg ZTM})^{-1}$. Die Daten, die in Abbildung 3.28 dargestellt sind, wurden in einem Hill-Diagramm graphisch aufgetragen. Zuerst wurden die Betainimportraten normalisiert. Die relativ konstante Betainimportrate im Bereich der internen K⁺-Konzentration von 20-113 mM stellt die Grundaktivität von BetP dar. Da diese Grundaktivität auch bei nichtstimulierenden Bedingungen vorhanden ist, kann sie als Nullreferenz betrachtet werden. Daher wurde der Mittelwert der Betainimportraten bei ≤ 113 mM K⁺ intern gebildet ($1,6 \pm 0,1$ $\text{nmol} \times (\text{min} \times \text{mg ZTM})^{-1}$) und von allen anderen Betainimportraten (inkl. V_{max}) abgezogen. Das Hill-Diagramm ist in Abbildung 3.29 dargestellt.

Ergebnisse

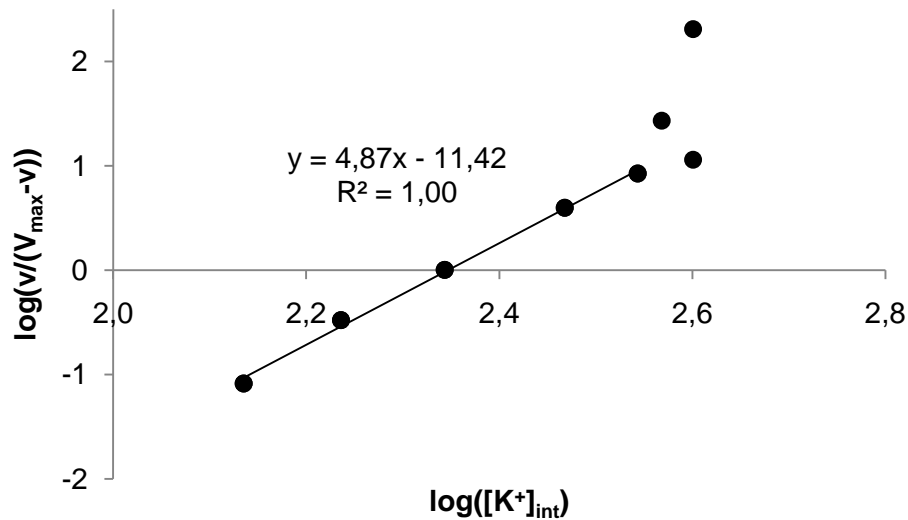


Abbildung 3.29: Hill-Auftragung der Betainimportraten in *C. glutamicum* DHPF(pBetP)-Zellen in Abhängigkeit der zytoplasmatischen K^+ -Konzentration. Die Regressionsgerade wurde für den linearen Graphbereich am Schnittpunkt mit der Abszissenachse konstruiert.

Der Graph verlief nicht im ganzen Wertbereich linear. Für die Hill-Diagramme ist es jedoch üblich, dass der Graph bei hohen und niedrigen Abszissenwerten keine lineare Steigung hat. Normalerweise ist der Graphenabschnitt um den Schnittpunkt mit der Abszissenachse linear, was bei dem dargestellten Diagramm zutrif. Es wurde eine Regressionsgerade im oben genannten Bereich konstruiert. Mithilfe der Geradengleichung wurde eine $K_{1/2}$ von 221 mM und ein n_H von 4,9 für K^+ in *C. glutamicum*-Zellen ermittelt.

3.4.2 Untersuchung der K^+ -Bindung an BetP in Proteoliposomen

Die K^+ -Bindung an BetP wurde ebenfalls in Proteoliposomen analysiert. Analog zu den Versuchen in *C. glutamicum*-Zellen wurde die BetP-Aktivität in Proteoliposomen in Abhängigkeit der K^+ -Konzentration im Lumen untersucht. Um die Genauigkeit der Bestimmung zu verbessern, wurden Proteoliposomen aus zwei unabhängigen Präparaten analysiert. Aus Proteoliposomen mit dem standardmäßig verwendeten Puffer (0,1 M KPi pH 7,5) wurden Vesikel mit 40 mM KPi, pH 7,5 (entspricht 72 mM K^+) hergestellt, um die Betainaufnahme bei geringem internen K^+ -Gehalt zu messen. Wie bereits erwähnt, konnte bei niedrigerem internen K^+ -Gehalt in Vesikeln kein Betainimport detektiert werden. Die interne K^+ -Konzentration in Proteoliposomen wurde durch das Variieren der externen Osmolalität sukzessive bis auf 301 mM erhöht und die BetP-Aktivität wurde gemessen (Abbildung 3.30).

Ergebnisse

Die maximale Betainimportrate wurde in den ursprünglichen Proteoliposomen mit 0,1 M KPi bei einer externen Osmolalität von 0,6 osmol/kg gemessen (resultierende interne K^+ -Konzentration: 480 mM). Der Grund dafür war, dass das Vesikelvolumen nach dem osmotisch bedingten Schrumpfen nicht weniger als 20 - 25 % des ursprünglichen Wertes betragen soll. Um die K^+ -Konzentration von 72 auf 480 mM zu erhöhen, wäre eine Volumenverringerung auf 14,7 % des Initialwertes nötig.

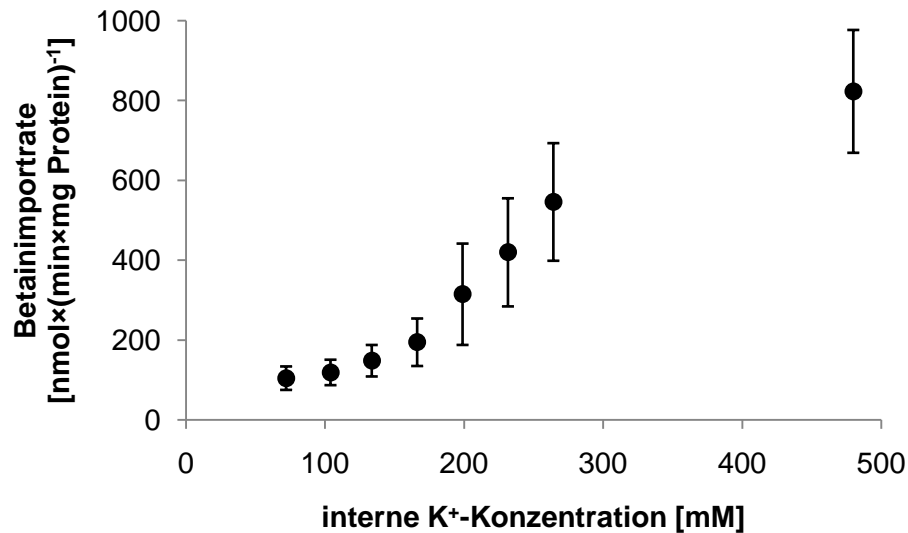


Abbildung 3.30: BetP-Transportaktivität in Proteoliposomen in Abhängigkeit der internen K^+ -Konzentration. Externer Puffer: 20 mM NaCl, 25 mM NaPi pH 7,5; 0,1 osmol/kg. Interner Puffer: 40 mM KPi, pH 7,5 (entspricht 72 mM K^+). Die K^+ -Konzentration im Vesikellumen wurde durch das Variieren der externen Osmolalität erhöht. Die externe Osmolalität wurde mit Sorbit eingestellt. Es wurden Vesikel aus zwei separaten Präparationen verwendet. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von mindestens neun Messungen mit Standardabweichungen von zwei unabhängigen Proteoliposomenpräparaten.

Die graphische Auftragung der Aktivität von rekonstituiertem BetP in Abhängigkeit der internen K^+ -Konzentration ergab eine sigmoide Kurve. Im Bereich der lumenalen K^+ -Konzentration von 72-104 mM wurde die BetP-Grundaktivität beobachtet. Diese betrug $112 \pm 31 \text{ nmol} \times (\text{min} \times \text{mg Protein})^{-1}$. Die bei ca. 480 mM K^+ intern gemessene maximale Betainimportrate betrug $823 \pm 154 \text{ nmol} \times (\text{min} \times \text{mg Protein})^{-1}$. Bei der Erstellung eines Hill-Diagramms wurde die Grundaktivität von allen anderen Werten inkl. V_{max} abgezogen (s. Abschnitt 3.4.1). Das Hill-Diagramm ist in Abbildung 3.31 dargestellt. Es wurde ein n_H von 5,2 sowie eine $K_{1/2}$ von 242 mM für K^+ in Proteoliposomen ermittelt.

Ergebnisse

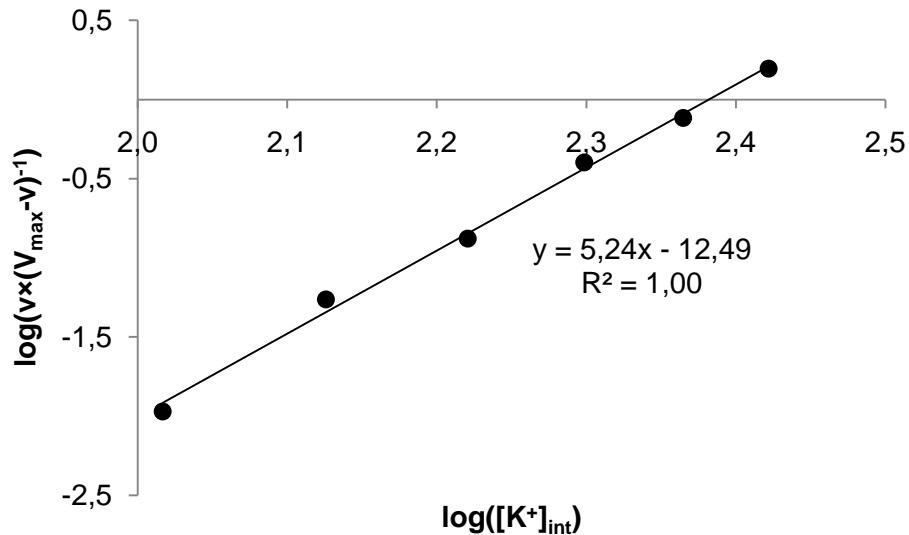


Abbildung 3.31: Hill-Auftragung der Betainimportraten in Abhängigkeit der K^+ -Konzentration im Proteoliposomenlumen. Die Regressionsgeraden wurden für den linearen Bereich des Graphen.

3.4.3 Untersuchung der K^+ -Bindung an BetP: Zusammenfassung

Um die Hypothese der potentiellen Kooperativität der K^+ -Bindung an BetP zu überprüfen, wurde die BetP-Aktivität in *C. glutamicum*-Zellen und in Proteoliposomen in Abhängigkeit des internen K^+ -Gehalts gemessen. Die graphische Auftragung der Betainimportraten gegen die K^+ -Konzentration im Zytoplasma bzw. Vesikellumen ergab jeweils eine sigmoide Kurve, die auf einen kooperativen Charakter der K^+ -Bindung deutet. Zusätzlich konnten Schwellenwerte für die K^+ -bedingte BetP-Aktivierung ermittelt werden. Die Graphen wurden nach Hill-Verfahren umgeformt und die $K_{1/2}$ - sowie n_H -Werte für K^+ wurden berechnet. Die Zusammenfassung der Daten ist in Tabelle 3.5 dargestellt. Die n_H -Werte von 4,9 in *C. glutamicum*-Zellen und 5,2 in Proteoliposomen deuten auf eine hohe Kooperativität der K^+ -Bindung an BetP hin. Da der n_H immer niedriger als die reale Anzahl der Bindestellen ist, sollte BetP mind. 5 Bindestellen für K^+ besitzen. Die Schwellenwerte für die K^+ -abhängige BetP-Aktivierung in lebenden Zellen (113 mM) und in Vesikeln (104) liegen sehr nah aneinander. In Proteoliposomen wurde die $K_{1/2}$ für K^+ von 243 mM berechnet, für *C. glutamicum*-Zellen betrug dieser Wert 221 mM.

Ergebnisse

Tabelle 3.5: Zusammenfassung der Analyse der K⁺-Bindung und BetP

	<i>C. glutamicum</i> - Zellen	BetP- Proteoliposomen
aktivierende interne K⁺-Konzentration [mM]	>113	>104
K_{1/2} [mM]	221	242
n_H	4,9	5,2

4. Diskussion

4.1 Untersuchung der K⁺-Bindung an BetP

Der sekundäraktive Transporter BetP aus *C. glutamicum* zeichnet sich zusätzlich durch die Eigenschaften eines Sensors und eines Regulators aus. Das Protein ist in der Lage, sowohl in Zellen als auch in Proteoliposomen (ohne weitere Proteinfaktoren) bei steigender externer Osmolalität seine Aktivität zu erhöhen (Peter *et al.*, 1998; Rübenhagen *et al.*, 2001). Diese Tatsache provozierte die Frage nach dem Stimulus, der mit dem hyperosmotischen Stress assoziiert ist und von BetP perzipiert werden kann. Die Untersuchung unterschiedlicher Parameter, die während des hyperosmotischen Schock verändert werden, auf die BetP-Aktivität in Proteoliposomen demonstrierte, dass die BetP-Stimulierung auf die Erhöhung der internen K⁺-Konzentration angewiesen ist. Rb⁺ und Cs⁺ haben zwar auch eine aktivierende Wirkung, sind jedoch nicht physiologisch relevant. Andere geladene (Na⁺, Glutamat⁻) sowie elektrisch neutrale Solute (Carnitin, Glucose) können BetP nicht stimulieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass BetP weder die Veränderung der internen Ionenstärke noch die des eigenen Hydratationsstatus wahrnimmt. Es lässt sich eher als ein Chemosensor charakterisieren (Rübenhagen *et al.*, 2001; Schiller *et al.*, 2004). Diese Spezifität für eine bestimmte Ionenspezies wurde bei den Regulationsstudien der beiden oben erwähnten Transporter OpuA und ProP nicht beobachtet. ProP wird in Proteoliposomen durch die Erhöhung der internen Konzentration von K⁺, Na⁺, Li⁺ sowie von PEG stimuliert und detektiert somit wahrscheinlich die Änderung seines Hydratationsstatus (Wood, 2006). OpuA wird in Vesikeln bei steigender interner Konzentration von K⁺ oder Na⁺ jedoch nicht von Glucose aktiviert. Es wurde deshalb vorgeschlagen, dass OpuA ein Sensor für die interne Ionenstärke ist (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006; van der Heide *et al.*, 2001).

Die C-terminale Extension von BetP ist in die Wahrnehmung des K⁺-assoziierten Stimulus involviert, da sowohl der Austausch einzelner Aminosäuren in dieser Domäne als auch die Verkürzungen zum teilweisen oder kompletten Verlust der Regulation *in vivo* und *in vitro* führen. Allerdings weist BetP in seinem nativen Organismus *C. glutamicum* eine höhere Toleranz gegenüber Mutationen im C-Terminus auf. BetP-Varianten, die in *E. coli*-Zellen bzw. in Proteoliposomen Regulationsstörungen zeigen, können in *C. glutamicum*-Zellen reguliert sein (V. Ott *et al.*, 2008). Obwohl die Beteiligung von K⁺ an der Aktivierung von BetP offensichtlich ist, konnte eine direkte Interaktion dieses Ions mit BetP lange nicht

Diskussion

nachgewiesen werden. Die neueren Experimente unserer Kooperationspartner aus dem MPI für Biophysik in Frankfurt demonstrierten, dass nach der Inkubation der BetP-Kristalle im Puffer mit 10 mM Rb^+ zwei Kationen pro BetP-Trimer spezifisch gebunden waren. Die Zahl der gebundenen Ionen erhöhte sich bei 300 mM Rb^+ extern bis auf fünf (persönliche Mitteilung Camilo Perez). In diesem Versuch wurde BetP im K^+ -haltigen Puffer kristallisiert und K^+ wurde bei der Inkubation der Kristalle mit RbCl durch Rb^+ ersetzt. Da Rb^+ einen ähnlichen Radius wie K^+ besitzt und BetP ebenfalls aktivieren kann (Rübenhagen *et al.*, 2001), sind die identifizierten Bindestellen in Zellen oder Proteoliposomen wahrscheinlich durch K^+ besetzt. Die Anwesenheit mehrerer Interaktionsstellen warf die Frage nach dem Charakter der K^+ -Bindung an BetP auf. Es wurden eine Reihe Versuche durchgeführt, um zu überprüfen, ob diese Bindung kooperativ oder nicht kooperativ ist.

Um den Bindungscharakter von K^+ an BetP zu analysieren, musste die BetP-Aktivität in Abhängigkeit der internen K^+ -Konzentration in Zellen und in Proteoliposomen untersucht werden. Während die Variation des internen K^+ -Gehalts in Vesikeln trivial ist, kann die Manipulation der zytoplasmatischen K^+ -Konzentration in intakten Zellen sehr aufwendig sein. Allerdings wurde bei der Charakterisierung der K^+ -Homöostase von *C. glutamicum* eine ungewöhnliche Toleranz des Bakteriums gegenüber einem sehr niedrigen internen K^+ -Gehalt von ca. 20 mM festgestellt (Follmann *et al.*, 2009). Dies ermöglichte eine sukzessive Veränderung der intrazellulären K^+ -Konzentration des Bakteriums von ca. 20 bis ca. 400 mM. Dafür wurden die K^+ -verarmten Zellen bei niedrigosmotischen Bedingungen 10 min bei externer K^+ -Konzentration von bis zu 1,75 mM inkubiert. Die Betainimportrate zeigte einen stark sigmoiden Verlauf bei steigendem internen K^+ -Gehalt. Für die Aktivierung von BetP in Zellen wurde die zytoplasmatische K^+ -Konzentration von >113 mM benötigt, die $K_{1/2}$ für K^+ lag bei ca. 220 mM. Der Hill-Koeffizient (n_H) von 4,9 deutet auf eine starke Kooperativität der K^+ -Bindung an BetP hin. Obwohl die Messungen der BetP-Aktivität bei unterschiedlicher interner K^+ -Konzentration in Proteoliposomen bereits in früheren Arbeiten durchgeführt wurden, mussten sie für die Charakterisierung der K^+ -BetP-Interaktion mit einer größeren Anzahl der Messpunkte wiederholt werden. Ebenfalls wie in Zellen, hatte die BetP-Aktivitätskurve eine sigmoide Form. Wegen der technischen Limitation konnte die K^+ -Konzentration in Vesikeln nicht wie in Zellen auf 20 mM herabgesetzt werden. Bei einer internen K^+ -Konzentration von unter 70 mM konnte mithilfe von Valinomycin kein für die BetP-Aktivität ausreichendes K^+ -Diffusionspotential aufgebaut werden. Da sich die Betainimportrate im Bereich von 72 - 104 mM nicht signifikant unterschied, handelt es sich

Diskussion

wahrscheinlich um die die Grundaktivität des Transporters, die vom internen K^+ -Gehalt unabhängig ist. Nach der Transformation der BetP-Aktivitätskurve in ein Hill-Diagramm wurde eine $K_{1/2}$ von 242 und n_H von 5,2 gemessen, die den analogen Werten in Zellen sehr ähnlich sind. Ein derart hoher Hill-Koeffizient weist auf einen hochkooperativen Charakter der K^+ -Bindung an BetP hin. Da n_H niedriger oder gleich der realen Bindestellenzahl ist, besitzt das BetP-Trimer wahrscheinlich mindestens fünf Bindestellen für K^+ . Mithilfe der Kristallstruktur ist es nicht möglich zu bestimmen, welche der mit BetP interagierenden Rb^+ -Ionen kooperativ an das Protein binden. Aufgrund der ermittelten aktivierenden K^+ -Konzentration tragen die Ionen, die bei der externen Rb^+ -Konzentration von $<0,1$ M an kristallisiertes BetP binden, nicht direkt zu seiner Aktivierung bei, sondern erfüllen andere Funktionen. Da der zytoplasmatische Loop 2 und die C-Domänen der benachbarten Protomere in die Koordination der Rb^+ involviert sind, dienen manche Ionen vermutlich der Stabilisierung der Trimerstruktur (persönliche Mitteilung Camilo Perez). Allerdings, muss berücksichtigt werden, dass sich die Bindestellenaffinität zu Rb^+ bei kristallisiertem BetP und bei BetP in einer Phospholipidmembran signifikant unterscheiden könnte. So könnten die Ionen, die bereits bei der Rb^+/K^+ -Konzentration von unter 0,1 M mit dem kristallisierten BetP assoziieren, erst bei höheren Konzentrationen an den in eine Membran inkorporierten Transporter binden. Außerdem besitzt das für die Kristallisation eingesetzte BetP $\Delta N29EEE$ (BetP $\Delta N29$ E44A E45A E46A) eine stark veränderte N-terminale Domäne welche die BetP-Aktivierung sowohl *in vivo* als auch *in vitro* signifikant beeinträchtigt (Ott *et al.*, 2008). Eventuell könnte auch die Interaktion des Transporters mit Rb^+ bzw. K^+ in der oben genannten BetP-Variante verändert sein. Die letztere Vermutung könnte theoretisch durch Messung der Transportaktivität von BetP $\Delta N29EEE$ in Abhängigkeit der intrazellulären K^+ -Konzentration in *C. glutamicum*-Zellen überprüft werden. Allerdings wies dieses BetP-Konstrukt selbst bei voller Stimulierung durch K^+ und Osmoschock eine sehr niedrige Betaintransportrate auf, die 10-15 % der Aktivität von BetP C252T entsprach (Ott, 2008). Die K^+ -bedingte Stimulierung allein würde wahrscheinlich zu einer noch geringeren BetP-Aktivierung führen, die nicht zuverlässig detektiert werden kann.

Um die für die BetP-Stimulierung relevanten Rb^+ -Bindestellen zu identifizieren, müssten die Aminosäuren, die für die Koordination von Rb^+ notwendig sind, ausgetauscht werden. Anschließend muss die Auswirkung dieser Mutationen auf K^+ -bedingte BetP-Aktivierung untersucht werden. Besonders interessant wären die Mutationen, die zu einer Verringerung des Hill-Koeffizienten führen.

4.2. BetP wird in lebenden Zellen durch zwei unterschiedliche Stimuli aktiviert

Bei der Untersuchung der BetP-Regulation in Proteoliposomen wurden mehrere Parameter getestet, die theoretisch als BetP-Stimuli fungieren könnten. Der Transporter wird nur durch die Zunahme der K^+ -Konzentration im Vesikellumen aktiviert (Rübenhagen, 2001). Obwohl Proteoliposomen sich für die Untersuchung der Transmembranproteine gut eignen und die gezielte Variation einzelner Parameter ermöglichen, stellen sie nur ein vereinfachtes und idealisiertes Modell dar, welches die Komplexität einer Zelle nicht wiedergibt. Somit können die in Proteoliposomen gewonnenen Erkenntnisse eventuell ein unvollständiges Bild über die Regulation eines Proteins liefern. Mehrere Experimente lieferten Hinweise darauf, dass die Erhöhung der internen K^+ -Konzentration nicht der einzige BetP-stimulierende Parameter ist. Dabei handelt es sich um die Untersuchung der Kälteaktivierung und ihrer Abhängigkeit von der Fettsäurezusammensetzung der Membran sowie von der TC-bedingten Stimulierung von BetP (Henrich, 2008; Özcan, 2006; Peter *et al.*, 1998; Rübenhagen *et al.*, 2001).

Die Analyse der BetP-Aktivierung in Zellen wird durch die Tatsache erschwert, dass die interne K^+ -Konzentration in *E. coli*- und *C. glutamicum*-Zellen, die als *in vivo*-Systeme für die BetP-Untersuchung verwendet werden, bei >300 mM liegt. Diese Konzentration ist ausreichend, um BetP in Proteoliposomen zu stimulieren (Rübenhagen *et al.*, 2001; Schiller *et al.*, 2004). Allerdings zeichnet sich *C. glutamicum* durch eine ungewöhnliche Toleranz gegenüber einem sehr niedrigen zytoplasmatischen K^+ -Gehalt von ca. 20 mM aus (Follmann *et al.*, 2009). Diese Erkenntnis bot die Möglichkeit, die intrazelluläre K^+ -Konzentration in *C. glutamicum* zu variieren und somit die Auswirkung des K^+ -assoziierten und des K^+ -unabhängigen Stimulus auf BetP in lebenden Zellen zu untersuchen. Dabei wurde der intrazelluläre K^+ -Gehalt der K^+ -verarmten Zellen durch die Supplementation des externen Mediums mit KCl verändert und/oder die externe Osmolalität wurde variiert. Die derartig differenzierte BetP-Stimulierung in *C. glutamicum*-Zellen wurde erstmals in einer früheren Studie (Ott, 2008) durchgeführt und in dieser Arbeit ausführlicher untersucht.

Wie in Proteoliposomen korrelierte die Beschleunigung der Betainimportrate mit der Zunahme der internen K^+ -Konzentration auch in Zellen (Tabelle 3.1, Abbildung 3.6, Abbildung 3.28). Die Wiederherstellung der normalen zytoplasmatischen K^+ -Konzentration von ca. 430 mM in K^+ -verarmten *C. glutamicum* führte zu einer ca. vierfachen Erhöhung der

Diskussion

Betainimportrate. Die Zellen mit deletierten K^+ -Aufnahmesystemen Cglk und Kup konnten kein K^+ akkumulieren und zeigten nur eine sehr niedrige BetP-Aktivität. Es muss betont werden, dass BetP in Zellen auf die Steigerung der internen K^+ -Konzentration reagiert, jedoch nicht auf einen konstant bleibend hohen zytoplasmatischen K^+ -Gehalt (wenn K^+ im externen Medium verfügbar ist). In K^+ -vorbeladenen *C. glutamicum*-Zellen, in denen die intrazelluläre K^+ -Konzentration bei niedrigosmotischen Bedingungen ca. 400 mM beträgt, zeigt BetP nur eine Grundaktivität. Die Steigerung der externen Osmolalität allein hatte eine erheblich schwächere Auswirkung auf die BetP-Aktivität als die Erhöhung des zytoplasmatischen K^+ -Gehalts. In *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen war die Beschleunigung der Betainimportrate bei dem osmotischen Schock von 0,24 auf 1 osmol/kg nicht signifikant, bei *C. glutamicum* $\Delta cglk/\Delta kup$ (pBetP)-Zellen war jedoch eine signifikante Änderung der BetP-Aktivität zu beobachten. Die generell niedrigere BetP-Aktivität in *C. glutamicum* $\Delta cglk/\Delta kup$ (pBetP)-Zellen lässt sich wahrscheinlich auf die geringe *betP*-Überexpression zurückführen. Dies wurde jedoch nicht überprüft.

Weder die Erhöhung der externen Osmolalität noch die Sättigung des Zytoplasmas mit K^+ waren allein in der Lage, BetP vollständig zu stimulieren. Die maximale Betainimportrate in *C. glutamicum*-Zellen wurde erst bei einer hohen intrazellulären K^+ -Konzentration von etwa 400 mM und gleichzeitig hochosmotischen Bedingungen festgestellt. Sie war ca. vierfach höher als bei reiner K^+ -Aktivierung und ca. zwölffach höher als bei reiner Osmoaktivierung. Die Vermutung, dass der schnellere Betainimport auf die Akkumulation größerer K^+ -Mengen in Zellen beim hyperosmotischen Stress zurückzuführen ist, konnte ausgeschlossen werden. Die intrazelluläre K^+ -Konzentration in *C. glutamicum* nach 10 min K^+ -Import bei 0,24 und 1 osmol/kg unterschied sich nicht signifikant, die Verringerung des Zytoplasmavolumens wurde dabei berücksichtigt. Diese Beobachtung zeigt, dass bei hyperosmotischen Bedingungen ein separater Stimulus aktiv wird, der die Wirkung des K^+ -Stimulus verstärkt. Es wurde bisher nicht im Detail geklärt, welcher Parameter, der beim hyperosmotischen Stress verändert wird, von BetP perzipiert werden kann. Einige Experimente deuten indirekt darauf hin, dass der physikalische Zustand der Membran einen Effekt auf die Regulation von BetP haben kann. So hat BetP in *C. glutamicum*-Zellen bei niedrigosmotischen Bedingungen ein Aktivitätsoptimum bei ca. 15 °C. Die Kälteaktivierung des Transporters beruht nicht auf der Veränderung der internen K^+ -Konzentration. Bei Kältestress ändert sich die intrazelluläre K^+ -Konzentration nicht. Allerdings wird die Kälteaktivierung von BetP durch die Fettsäurezusammensetzung der Membran beeinflusst. Daher wurde vorgeschlagen, dass der

Diskussion

Kältestimulus von BetP mit der Veränderung der physikalischen Parameter der Membran assoziiert ist (Özcan *et al.*, 2007, 2005). Beim hyperosmotischen Stress wird der physikalische Zustand der Membran auch geändert. So wurde berichtet, dass osmotisch aktive Solute u.a. durch die Änderung der Interphasenspannung einer Lipiddoppelschicht an der Lipid/Wasser-Grenze das laterale Druckprofil dieser beeinflussen können (Söderlund *et al.*, 2003). Diese Änderungen könnten theoretisch von BetP wahrgenommen werden.

Um die Natur des alternativen, K^+ -unabhängigen BetP-Stimulus zu untersuchen, wurde nach einer alternativen Methode gesucht, mit welcher die Auswirkung des hyperosmotischen Schocks auf BetP simuliert werden könnte. Da der K^+ -unabhängige BetP-Stimulus wahrscheinlich mit der Veränderung des physikalischen Zustands der Membran assoziiert ist, wurde für diesen Zweck die amphipathische Verbindung Tetracain (TC) verwendet, die für die lokale Anästhesie eingesetzt wird. TC kann in eine Phospholipidmembran interkalieren und ihren physikalischen Zustand beeinflussen (Auger *et al.*, 1988). Manche Anästhetika können nach der Insertion in eine Phospholipiddoppelschicht deren laterales Druckprofil signifikant ändern, was wiederum wahrscheinlich das Gleichgewicht der Konformationszustände der Membranproteine beeinflussen kann (Cantor, 1997a; Cantor, 1997b). Die stimulierende Wirkung von TC auf Transmembranproteine wurde in mehreren Arbeiten beschrieben. So konnten mechanosensitive Kanäle aus *E. coli* in Gegenwart von TC bei einer geringeren Membranspannung aktiviert werden (Martinac *et al.*, 1990). In *C. glutamicum* wurde die Exkretion von Glutamat in Anwesenheit von TC beobachtet (Lambert *et al.*, 1995). Mittlerweile ist bekannt, dass der Glutamatefflux in *C. glutamicum* durch den mechanosensitiven Kanal MscCG vermittelt wird (Becker *et al.*, 2013). Demzufolge wird das *gating*-Verhalten von MscCG wahrscheinlich durch TC beeinflusst. Bei den früheren Studien der BetP-Regulation wurde demonstriert, dass TC die BetP-Aktivität sowohl in intakten Zellen als auch in Proteoliposomen erhöhen kann (Peter *et al.*, 1998a; Rübenhagen, 2001; Steger *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Auswirkung von TC auf die BetP-Aktivität in K^+ -verarmten *C. glutamicum*-Zellen analysiert. Die stärkste BetP-Aktivierung bei niedrigosmotischen Bedingungen wurde bei der externen TC-Konzentration von 0,8 mM festgestellt. Da amphipathische Verbindungen, die in die Membran interkalieren, die Integrität der Phospholipiddoppelschicht beeinträchtigen können, wurde geprüft, ob die verwendete TC-Konzentration einen Einfluss auf das Membranpotential hat. Dies wurde indirekt getestet,

Diskussion

indem die Betainakkumulation in Zellen bis zur Sättigung bei unterschiedlichen TC-Konzentrationen gemessen wurde. Da die aufgenommene Betainmenge im Gleichgewichtszustand vom Membranpotential abhängt, würde die Verringerung des letzteren zum geringeren intrazellulären Betaingehalt führen. Allerdings wurde keine Verringerung der internen Betainkonzentration beim externen TC-Gehalt von ≤ 1 mM festgestellt (Abbildung 3.15), was impliziert, dass das Membranpotential bei 0,8 mM TC nicht beeinträchtigt ist. Anschließend wurde die Auswirkung von TC auf BetP in unterschiedlichen Kombinationen mit anderen Stimuli untersucht (Abbildung 3.14, Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Relative BetP-Aktivität in *C. glutamicum* DHPF (pBetP)-Zellen bei der differenzierten Stimulierung durch K^+ , hyperosmotischen Schock und TC. Dargestellt sind Mittelwerte von jeweils drei Messungen mit Standardabweichungen.

externes TC [mM]	intrazelluläres K^+ [mM]	relative BetP-Aktivität [%]	
0	19 ± 1	$6,2 \pm 3$	$8,4 \pm 2,3$
0	430 ± 8	$26,9 \pm 8,6$	$100 \pm 19,2$
0,8	19 ± 1	$57,4 \pm 14$	$26,1 \pm 15,4$
0,8	430 ± 8	$84,8 \pm 12,6$	$94,8 \pm 16,9$
		0,24	1
externe Osmolalität [osmol/kg]			

Dabei wurde eine ungewöhnlich intensive Erhöhung der Betainimportrate durch TC bei nichtstimulierender externer Osmolalität und niedriger interner K^+ -Konzentration festgestellt (von 6,2 % auf 57,4 % der höchsten Aktivität). Die BetP-Aktivierung bei hyperosmotischen Bedingungen war erheblich schwächer als die Aktivierung durch TC. In Gegenwart der hohen intrazellulären K^+ -Konzentration und TC im externen Medium betrug die Betainimportrate ca. 85 % der maximalen Aktivität. Der hyperosmotische Schock führte in Kombination mit dem K^+ -abhängigen Stimulus zur höchsten BetP-Aktivität. Diese maximale Aktivität konnte durch TC nicht weiter erhöht werden. So wurde das durch Kälte aktivierte BetP bei 10 °C durch TC auch nicht stimuliert, weil der Transporter wahrscheinlich die höchstmögliche Betainimportrate bei diesen Bedingungen schon erreicht hat (Özcan, 2006). Die beschriebenen Beobachtungen werfen die Frage nach dem Mechanismus der TC-induzierten Stimulierung auf. Die Erhöhung der intrazellulären K^+ -Konzentration im K^+ -freien Medium kann ausgeschlossen werden, jedoch ist eine starke BetP-Aktivierung durch TC bei diesen

Diskussion

Bedingungen zu beobachten. Außerdem, konnte die BetP-Aktivierung durch TC bei hohem internem K^+ -Gehalt gesteigert werden, was darauf hinweist, dass die beiden Stimuli unabhängig voneinander detektiert werden. Demzufolge ähnelt die Wirkung von TC eher der Osmostimulierung und nicht der K^+ -Stimulierung.

Bei niedrigem intrazellulären K^+ -Gehalt verlangsamte sich die Betainimportrate in Gegenwart von TC, nachdem die Zellen dem hyperosmotischen Schock ausgesetzt wurden, sogar um ~50 %. Da eine Verringerung des Membranpotentials bei der eingesetzten TC-Konzentration nicht festgestellt wurde, muss die Abnahme der Betainimportrate eine andere Erklärung haben. Der wahrscheinliche Grund für die Verlangsamung des Betainimports ist, dass die hochosmotischen Bedingungen in Kombination mit TC eine Stresssituation für die Zellen darstellen könnten. Das Ausmaß dieses Stresses ist bei der anormal niedrigen zytoplasmatischen K^+ -Konzentration höher als beim normalen K^+ -Gehalt und führt somit im ersten Fall zur stärkeren Verringerung der Betainimportrate. Die genaue Natur des TC-bedingten Stresses bei hochosmotischen Bedingungen ist jedoch nicht bekannt.

Obwohl die stimulierenden Effekte von TC und Osmoschock auf die BetP-Aktivität ähnliche Natur haben könnten, dürfen sie wegen folgenden Beobachtungen nicht einfach gleichgesetzt werden. Das Ausmaß der BetP-Aktivierung durch TC war deutlich höher als allein durch osmotische Stimulierung. Es muss auch berücksichtigt werden, dass BetP $\Delta C45$ sich ebenfalls durch TC stimulieren ließ, obwohl dieses Protein in *C. glutamicum*-Zellen eine von der externen Osmolalität unabhängige Aktivität zeigte (Abbildung 3.16). In *E. coli*-Zellen und in Proteoliposomen wurde auch deregulierte Aktivität von BetP $\Delta C45$ festgestellt (Schiller *et al.*, 2004). Dieses Ergebnis impliziert, dass TC einen weiteren stimulierenden Effekt auf BetP ausüben kann, der sich von der Wirkung des hyperosmotischen Schocks unterscheidet. Dieser Effekt ist wahrscheinlich für die starke BetP-Aktivierung durch TC in K^+ -verarmten Zellen bei niedriger externer Osmolalität verantwortlich. Bei dem oben genannten Effekt könnte es sich theoretisch auch um eine direkte Interaktion von TC und BetP handeln. Solche Interaktionen mit anderen Proteinen sind bereits bekannt. Beispielsweise werden Ryanodinrezeptoren (RyRs, Ca^{2+} -Kanäle aus dem sarcoplasmatischen Retikulum) durch TC inhibiert, wobei das Anästhetikum sowohl die Leitfähigkeit als auch die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals verringert. Das Protein hat mehrere Bindestellen, mit welchen TC wechselwirken kann, um unterschiedliche inhibitorische Wirkungen hervorzurufen (Laver und Van Helden, 2011). TC agiert auch als nicht-kompetitiver Blocker

Diskussion

für den Acetylcholinrezeptor (Na⁺-Kanal) aus *Torpedo marmorata*. Es setzt die Affinität des Proteins zu Acetylcholin herab und verschiebt das Konformationsgleichgewicht zu nicht aktiven Formen (Boyd und Cohen, 1984). Die Elektronenspinresonanzuntersuchungen demonstrierten, dass TC mit den Phospholipiden für die Bindestellen am Protein konkurrieren kann (Mantipragada *et al.*, 2003). Alternativ könnte TC die physikalischen Parameter der Lipidmembran erheblich stärker verändern als der hyperosmotische Schock. Falls die Änderung dieser Parameter einen Einfluss auf die BetP-Aktivierung hat, wäre ein schnellerer Betainimport in Gegenwart von TC zu erwarten.

Die Wirkung der anderen amphiphilen Verbindung Lysophosphatidylcholin (LPC) auf die BetP-Aktivität ist schwieriger zu interpretieren. Die signifikante Steigerung der BetP-Aktivität in Gegenwart von LPC wurde nur in K⁺-vorbeladenen *C. glutamicum*-Zellen bei einer externen Osmolalität von 0,24 - 0,6 osmol/kg, jedoch nicht bei höheren Werten festgestellt. Bei einer intrazellulären K⁺-Konzentration von ca. 20 mM ließ sich die Betainimportrate durch LPC bei niedrigosmotischen Bedingungen nicht signifikant erhöhen (Daten nicht gezeigt). Die Erhöhung der externen Osmolalität zeigte jedoch in K⁺-verarmten Zellen ebenfalls keine signifikante BetP-Aktivierung. Die oben erwähnten Beobachtungen könnten so interpretiert werden, dass LPC einen analogen Effekt auf BetP hat wie der hyperosmotische Stress, und dass die beiden Stimuli auf eine ähnliche Weise wahrgenommen werden. Daher könnte sich die Wirkung von LPC ab einer bestimmten Intensität des Osmostress-assoziierten Stimulus mit dem letzteren überlagern und die BetP-Aktivität nicht weiter erhöhen. Allerdings konnte der aktivierende Effekt von BetP durch LPC weder in *E. coli*-Zellen noch in Proteoliposomen aus reinen *E. coli*-Lipiden oder mit einem POPG-Anteil von 66 % (*C. glutamicum*-ähnliche Lipidzusammensetzung) nachgewiesen werden. Für die oben angeführten Ergebnisse gibt es keine offensichtliche Erklärung.

Zusammengefasst lässt sich BetP durch drei natürliche Stimuli aktivieren. Der K⁺-abhängige Stimulus ist für die vollständige BetP-Aktivierung essenziell, aber nicht ausreichend (Ott, 2008). Die Wirkung von K⁺ wird durch den mit hyperosmotischem Schock assoziierten Stimulus verstärkt und führt zur maximalen Erhöhung der Betainaufnahme in *C. glutamicum*-Zellen. Zusätzlich kann BetP in *C. glutamicum*-Zellen durch den Kälte-assoziierten Stimulus bei niedrigosmotischen Bedingungen aktiviert werden. Dieser Stimulus ist wie der Osmostimulus ebenfalls K⁺-unabhängig, seine Perzeption jedoch unterscheidet sich von Letzterem. Dies wird durch die Tatsache bestätigt, dass BetP $\Delta C25$

durch niedrige Temperatur, jedoch nicht bei hochosmotischen Bedingungen aktiviert wird (Özcan, 2006). In Proteoliposomen reagiert BetP $\Delta C25$ nicht auf die Erhöhung des internen K^+ -Gehalts (Schiller *et al.*, 2004). Somit ist die C-terminale Domäne in die Perzeption sowohl des K^+ -abhängigen als auch des osmo-assoziierten Stimulus involviert. Da die Fettsäurezusammensetzung sowohl auf die Kälte- als auch auf die Osmoaktivierung von BetP einen Einfluss hat, werden die beiden Stimuli wahrscheinlich vom physikalischen Zustand der Membran beeinflusst. Diese Hypothese wird durch die aktivierende Wirkung der amphipatischen Verbindungen LPC und TC auf BetP unterstützt. LPC und TC beeinflussen die physikalischen Parameter der Membran wie z.B. das laterale Druckprofil und die Dichte/Packung der Lipidkopfgruppen. Die TC- bzw. LPC-bedingte BetP-Aktivierung ähnelt eher dem Effekt des Osmo- bzw. Kältestimulus, jedoch nicht dem K^+ -abhängigen Stimulus.

4.3 Der Aktivierungszustand von BetP in Proteoliposomen

Die Identifizierung des K^+ -unabhängigen, Osmostress-bedingten BetP-Stimulus, welcher in Kombination mit dem K^+ -assoziierten Stimulus für die maximale Betainimportrate in *C. glutamicum*-Zellen notwendig ist, warf die Frage nach dem Stimulierungszustand des Transporters in Proteoliposomen auf. In Vesikeln wurde BetP nicht durch die Steigerung der externen Osmolalität *per se* stimuliert, sondern durch die Erhöhung der internen K^+ -Konzentration, welche durch die osmotisch bedingte Volumenverringernung der Proteoliposomen zustande kommt (Rübenhagen, 2001). Die beschriebenen Ergebnisse lassen auf zwei Interpretationen des Aktivierungszustands von BetP *in vitro* schließen. Der K^+ -unabhängige Stimulus könnte in Proteoliposomen nicht aktiv sein bzw. nicht effektiv von BetP perzipiert werden (i). Dies würde bedeuten, dass BetP in Vesikeln nur eine Teilaktivität aufweist. Die letztere wäre mit der BetP-Aktivität vergleichbar, die in K^+ -verarmten *C. glutamicum*-Zellen bei der Erhöhung des internen K^+ -Gehalts bei niedriger externer Osmolalität erreicht wird (Abbildung 3.1, Tabelle 4.1). Alternativ könnte BetP in Proteoliposomen bei hoher interner K^+ -Konzentration schon die maximale Transportaktivität aufweisen (ii), wie in Zellen mit einem hohen zytoplasmatischen K^+ -Gehalt bei hochosmotischen Bedingungen. Für die Bestimmung des Aktivierungszustandes von BetP *in vitro* muss die BetP-Aktivität in Zellen und in Proteoliposomen verglichen werden. Allerdings kann die Betainimportrate in diesen zwei Systemen nicht direkt gegenübergestellt werden, da die Betainaufnahme in lebenden Zellen auf die Zelltrockenmasse (ZTM) und in

Diskussion

Vesikeln auf die Proteinmasse bezogen wird. Es gibt jedoch eine Größe, die für beide Testsysteme universell und somit vergleichbar ist. Dies ist die molekulare Aktivität bzw. die Wechselzahl von BetP, die angibt, wie viele Substratmoleküle pro Transporter pro Minute bei V_{\max} transloziert werden. Für die Bestimmung der molekularen Aktivität von BetP sind drei Parameter notwendig: die Betainimportrate (i), die BetP-Konzentration (ii) und der Anteil aktiver BetP-Moleküle (iii).

Die Betaintransportmessungen in Zellen und in Proteoliposomen wurden bereits vor mehreren Jahren etabliert und stellen in unserem Labor eine Routinemethode dar. Der BetP-Gehalt in Proteoliposomen lässt sich sehr einfach mittels der Amidoschwarz-Methode bestimmen. Da gereinigtes BetP das einzige, in signifikanten Mengen vorhandene Protein in Vesikeln ist, ist die Proteinkonzentration gleich der BetP-Konzentration. In Zellen macht BetP dagegen nur einen geringen Anteil der gesamten Proteine aus. Daher musste BetP zuerst aus dem Zellhomogenisat durch die Solubilisierung extrahiert werden und anschließend in diesem Solubilisat quantitativ immunologisch nachgewiesen werden. Die Abschätzung des aktiven Anteils von BetP sowohl in Vesikeln als auch in Zellen stellt die größte Herausforderung dar. Dieser Parameter ist aber für die korrekte Bestimmung der Wechselzahl des Transporters essenziell. Da die Wechselzahl eines Proteins auf dessen Menge bezogen wird, würde ein hoher Anteil inaktiver Proteinmoleküle zur Unterschätzung des Wertes führen. In Zellen kann zwar der tatsächliche Anteil inaktiver BetP-Moleküle nicht ermittelt werden, es kann jedoch überprüft werden, ob inaktives BetP nach längerer Überexpressionszeit akkumuliert wird. Dies wurde durch die Bestimmung der molekularen Aktivität des Transporters zu unterschiedlichen Expressionszeitpunkten getestet. Für die Abschätzung des aktiven BetP-Anteils *in vitro* wurde eine Methode entwickelt, die auf der Titration von Liposomen mit BetP basiert.

Es muss berücksichtigt werden, dass für die Bestimmung der BetP-Aktivität *in vivo* *E. coli* MKH13 (pBetP)-Zellen verwendet wurden, weil sie eine analoge Membranzusammensetzung wie die hier verwendeten Proteoliposomen haben und sich leichter aufschließen lassen als *C. glutamicum*-Zellen. Die differenzierte BetP-Stimulierung in *E. coli* war jedoch nicht durchführbar, weil das Bakterium die extrem niedrige intrazelluläre K^+ -Konzentration, die in *C. glutamicum* erreicht werden kann, nicht toleriert. Daher kann man in *E. coli*-Zellen nur die Wechselzahl von BetP bei vollstimulierenden Bedingungen ermitteln, d.h. bei hoher zytoplasmatischer K^+ -Konzentration und hochosmotischen Bedingungen. Die

Diskussion

BetP-Aktivität nur bei der K^+ -abhängigen Stimulierung ist in *E. coli*-Zellen daher nicht bekannt. In *C. glutamicum*-Zellen zeigte BetP bei K^+ -bedingter Aktivierung ca. 25 % der maximalen Transportrate. Dieser Wert könnte jedoch in *E. coli*-Zellen - u.a. wegen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung der Plasmamembran - anders sein.

Um zu überprüfen, ob im Laufe der Überexpression von BetP in *E. coli* MKH13 (pBetP)-Zellen inaktives BetP akkumuliert wird, wurde zuerst die Betainimportrate nach unterschiedlichen Überexpressionszeiten bestimmt. Die BetP-Synthese in Zellen verlief sehr schnell. Bereits 15 min nach Induktion der Überexpression betrug die Betainimportrate ca. 75 % des maximalen Werts, welcher nach 2 h erreicht wurde (Abbildung 3.20). Die Zellen wurden homogenisiert, das Homogenisat wurde mit Lauroylsarcosin solubilisiert und die nicht solubilisierten Partikeln wurden durch Zentrifugation entfernt. Um zu überprüfen, ob die Proteinextraktion effizient war, wurde der Proteingehalt im Überstand und im Sediment gemessen. Im Sediment mit nicht solubilisierten Partikeln wurden nur ca. 3 % des Gesamtproteins nachgewiesen. Allerdings konnte der BetP-Gehalt in diesem Sediment nicht bestimmt werden. Im Überstand konnte BetP immunologisch mithilfe von anti-Strep- und anti-BetP-Antikörpern quantifiziert werden. Für die Kalibrierung der Western Blots wurde gereinigtes Strep-BetP in Kombination mit dem Zellextrakt von *E. coli* MKH13 (ohne *betP*-kodierendes Plasmid) verwendet. Die Messungen mit unterschiedlichen Antikörpern lieferten ähnliche Ergebnisse, der BetP-Gehalt im Zellextrakt variierte innerhalb einer Stunde nach der Induktion der Überexpression zwischen 2,1-3,0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ZTM (Tabelle 3.2; Tabelle 3.3). Da der BetP-Gehalt in nicht solubilisierten Partikeln nicht bestimmt werden konnte, ist es möglich, dass ein Transporteranteil bei der Quantifizierung nicht erfasst werden konnte und der tatsächliche BetP-Gehalt in den Zellen höher sein könnte als der immunologisch ermittelte. Daher kann eine irrtümlich zu hohe Bestimmung der BetP-Aktivität in Zellen nicht ausgeschlossen werden. Bei der Bestimmung der BetP-Konzentration in Zellen wurde eine unerwartete Abnahme des BetP-Gehalts nach einer längeren Überexpressionsdauer von 2 und 3 h beobachtet, obwohl die Betainimportrate sich nicht verringerte. Die Vermutung, dass dieses Phänomen durch den Abbau des StrepII-Tags, der vom Primärantikörper erkannt wird, bedingt sein könnte, hat sich nicht bestätigt. Die Verringerung des BetP-Gehalts wurde ebenfalls mithilfe von anti-BetP-Antikörpern festgestellt. Die Abnahme der BetP-Konzentration in Zellen bei konstanter Betainimportrate ergibt keinen Sinn und lässt sich wahrscheinlich auf ein Artefakt zurückführen. Daher wurde die molekulare Aktivität von BetP in *E. coli*-Zellen nach 2 und 3 h Überexpression nicht berechnet. Während der ersten

Diskussion

Stunde änderte sich die molekulare BetP-Aktivität nicht signifikant und betrug im Durchschnitt ca. $3300 \pm 350 \text{ min}^{-1}$ (Tabelle 3.4). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass innerhalb einer Stunde nach der Induktion der Überexpression der Anteil inaktiver BetP-Moleküle nicht zunimmt.

Bei der Bestimmung der molekularen Aktivität von BetP in Proteoliposomen war die BetP-Quantifizierung erheblich einfacher als in Zellen. Die Proteinbestimmung in Vesikeln erfolgte mittels der Amidoschwarz-Methode. Da das gleiche gereinigte BetP für die Kalibrierung der quantitativen WesternBlots mit Zellextrakten eingesetzt wurde, kann die BetP-Konzentration in Proteoliposomen mit der in Zellen direkt miteinander verglichen werden, ohne den Transporter in den Vesikeln immunologisch quantifizieren zu müssen.

Für die Bestimmung des Anteils aktiver BetP-Moleküle in Proteoliposomen wurde ein komplexes Experiment entwickelt. Zuerst werden Proteoliposomen mit unterschiedlichem Protein/Lipid-Verhältnis (PLV) erstellt. Die Steigerung von PLV erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass ein Vesikel einen in die Membran integrierten aktiven Transporter enthält und dadurch Betain aufnehmen kann. Die Vesikel werden in einen betainhaltigen Puffer überführt und die aufgenommene Betainmenge nach der Sättigung der Vesikel mit dem Substrat gemessen. Je höher die PLV einer Proteoliposomensuspension, desto mehr Betain kann in den Vesikeln akkumuliert werden. Es muss betont werden, dass für diesen Versuch nicht die Geschwindigkeit des Betainimports von Bedeutung ist, sondern die gesamte akkumulierte Betainmenge in einer Vesikelpopulation. Bei einem bestimmten PLV, das als PLV_{sat} bezeichnet wird, wird jedes Vesikel theoretisch ein einzelnes aktives BetP in der Membran enthalten, wodurch die maximale Betainmenge in einer Proteoliposomenpopulation akkumuliert wird. Bei höheren PLV-Werten wird die Sättigung lediglich schneller erreicht. Ein weiterer Schritt für die Berechnung des Anteils aktiver BetP-Moleküle in Proteoliposomen ist die Bestimmung der durchschnittlichen Vesikelmasse. Dafür muss die Vesikelgröße, die Lipidanzahl pro Vesikel und die molare Masse eines Lipids bekannt sein. Anschließend wird das PLV eines Proteoliposoms mit einem einzelnen BetP-Trimer berechnet. Der Quotient des theoretischen PLV und des experimentell bestimmten PLV_{sat} ergibt den Anteil der katalytisch aktiven BetP-Trimere.

Die vorgeschlagene Methode kann nur unter der Voraussetzung angewendet werden, dass die Vesikelgröße und die BetP-Aktivität in Proteoliposomen mit unterschiedlichem PLV sich

Diskussion

nicht stark unterscheiden. Die Vermessung der Proteoliposomengröße mittels dynamischer Lichtstreuung ergab, dass der mittlere Vesikelradius im PLV-Bereich von 4,2-25 mg/g mit $126,9 \pm 3,7$ nm konstant war (Abbildung 3.24). Die durchschnittliche Betainaufnahme in diesen Vesikeln war auch vergleichbar hoch und betrug 166 ± 27 nmol Betain/ μ g Protein (Abbildung 3.25). Da die beiden Bedingungen für die hergestellten Vesikel erfüllt wurden, wurden die Proteoliposomen mit Betain bis zur Sättigung beladen und die aufgenommene Betainmenge wurde gegen das PLV graphisch aufgetragen. Dabei ergab sich eine Sättigungskurve, aus der PLV_{sat} abgeleitet wurde, bei dem jedes Vesikel theoretisch ein aktives BetP-Molekül enthält. Dieser Wert betrug $12,48 \pm 0,62$ mg/g oder $1:80 \pm 4$ (Abbildung 3.26). Mithilfe dieser Zahl wurde der Anteil der aktiven BetP-Moleküle in Proteoliposomen mit 3 % bestimmt. Da die Berechnung des Anteils von funktionell aktiven Transportern nach der Rekonstitution in Liposomen bisher nur für den Adeninnukleotid-Transporter durchgeführt wurde, gibt es kaum Referenzen, mit denen der Wert verglichen werden kann. Der erwähnte Adeninnukleotid-Carrier wies nach der Rekonstitution in Liposomen ~ 8 % der ursprünglichen Aktivität in Mitochondrien auf (Krämer und Klingenberg, 1977). Daher ist eine massive Verringerung des Anteils aktiver Proteine nach der Rekonstitution in Vesikeln anzunehmen. Die durch den geringen Anteil des aktiven Transporters in Proteoliposomen resultierende BetP-Wechselzahl betrug 2433 ± 466 min^{-1} . Die molekulare Aktivität von BetP in *E. coli*-Zellen lag bei 3300 ± 350 min^{-1} . Unter Berücksichtigung des möglichen BetP-Verlustes bei der Proteinextraktion aus dem Zellhomogenisat von *E. coli* und der daraus resultierenden Unterbestimmung des BetP-Gehalts, könnte die tatsächliche Wechselzahl von BetP in *E. coli*-Zellen eher geringer sein. Somit ist die BetP Aktivität *in vitro* und *in vivo* (bei voller Aktivierung) ähnlich.

Es wurde überprüft, wie sich die Änderung einiger Parameter, die bei den Kalkulationen verwendet wurden, auf den ermittelten Anteil aktiver BetP-Moleküle auswirkt. Die Variation der durchschnittlichen Oberfläche eines einzelnen Phospholipids von $0,6 - 0,7$ nm^2 würde den Betrag der molekularen Aktivität nur um ca. 10 % beeinflussen. Das PLV_{sat} , das mithilfe der extrapolierten Regressionsgeraden berechnet wird, stellt eine weitere Fehlerquelle dar. Bei einem unabhängigen Versuch mit anderen Proteoliposomenpräparaten wurde ein PLV_{sat} von 1:71 ermittelt (Daten nicht gezeigt). Wahrscheinlich liegt das PLV_{sat} in BetP-Proteoliposomen im Bereich von 1:70 - 1:80. Allerdings würde das Einsetzen des PLV_{sat} von 1:71 in die Berechnung zum Anteil der aktiven BetP-Moleküle von ca. 2,7 % und zur molekularen Aktivität von ca. 2720 min^{-1} führen. Diese Änderung wäre ebenfalls nicht signifikant. Die

Diskussion

Größe der Vesikel hat auch einen Einfluss auf den berechneten Anteil des aktiven BetP. Bei der Veränderung des Proteoliposomenradius um 10 nm würde die molekulare Aktivität von BetP ca. 2050 - 2800 min⁻¹ betragen, bei einem Unterschied von 20 nm ca. 1710 - 3230 min⁻¹. Es wäre daher vorteilhaft, die Vermessung der Proteoliposomengröße mit einer alternativen Methode, beispielsweise mit TRPS (*tunable resistive pulse sensing*) bzw. Kryoelektronentomographie durchzuführen.

Die Untersuchung der TC-Auswirkung auf die BetP-Aktivität in *C. glutamicum*-Zellen und in Proteoliposomen führt ebenfalls zur Schlussfolgerung, dass der Aktivierungszustand von BetP in Proteoliposomen dem in Zellen bei voller Stimulierung ähnlich ist. Dies wird deutlich, wenn man die relative BetP-Aktivität in *C. glutamicum*-Zellen bei der differenzierten Stimulierung durch TC, K⁺ und hyperosmotischen Stress mit der in Proteoliposomen bei der differenzierten Stimulierung durch TC und K⁺ vergleicht (Abbildung 3.19). Das Aktivierungsprofil von BetP in Proteoliposomen weist eine Ähnlichkeit mit dem von *C. glutamicum* unter hochosmotischen Bedingungen auf. Trotz dieser Ähnlichkeit sind bei den beiden erwähnten Aktivierungsprofilen Unterschiede zu beobachten. Die Grundaktivität von BetP in Proteoliposomen war ca. dreifach höher als in Zellen. Diese Differenz lässt sich wahrscheinlich auf die unterschiedliche interne K⁺-Konzentration zurückführen. In K⁺-verarmten Zellen beträgt diese ca. 20 mM und in Proteoliposomen mit niedrigem K⁺-Gehalt ca. 70 mM. Außerdem kann ein niedriger Anteil negativ geladener Phospholipidkopfguppen zur höheren BetP-Aktivität in Proteoliposomen beitragen. Um die beiden Vermutungen zu überprüfen, sollte die TC-Wirkung auf die BetP-Aktivierung in *C. glutamicum*-Zellen mit dem zytoplasmatischen K⁺-Gehalt von 70 mM und in Proteoliposomen mit einem hohen Anteil saurer Phospholipide analysiert werden.

Am Anfang dieser Arbeit wurde die Frage nach dem Aktivierungszustand von BetP im rekonstituierten System gestellt. Es wurden zwei Modelle vorgeschlagen, die den Aktivierungsstatus von BetP in Proteoliposomen beschreiben würden. Im ersten Modell wurde vermutet, dass BetP *in vitro* nur eine Teilaktivität aufweist, analog zu intakten Zellen bei der K⁺-bedingten Stimulierung allein. Im zweiten wurde vorgeschlagen, dass BetP in Vesikeln die maximale Aktivität erreicht, analog zu Zellen mit einer hohen internen K⁺-Konzentration bei hochosmotischen Bedingungen. Die Ergebnisse der zwei unabhängigen Experimente unterstützen das zweite Modell. Die molekulare Aktivität von BetP in Zellen bei voller Stimulierung und in Proteoliposomen war vergleichbar groß (i). Außerdem wies die

Diskussion

TC-bedingte BetP-Aktivierung in Vesikeln eine starke Ähnlichkeit mit der in Zellen bei hochosmotischen Bedingungen auf (ii). Daraus folgt, dass rekonstituiertes BetP im gleichen Aktivierungszustand vorliegt wie BetP, welches in Zellen dem Osmoschock-assoziierten Stimulus ausgesetzt ist.

Die Schlussfolgerung, dass der alternative BetP-Stimulus in Proteoliposomen permanent wirksam ist, ist nicht trivial und wirft die Frage nach der Natur dieses Stimulus auf. Der hyperosmotische Stress kann in Liposomen nicht auftreten bzw. wird schnell aufgehoben, weil die Vesikel im hypertonen Medium durch den Wasserverlust schrumpfen, bis das Außen- und Innenmedium isoosmotisch ist. Es ist weitgehend unklar, welcher Parameter in der Membran eines artifiziellen Lipidvesikels und der Plasmamembran einer Zelle, die einer hohen externen Osmolalität ausgesetzt ist, ähnlich sein kann und auf BetP stimulierend wirkt. Es ist extrem unwahrscheinlich, dass es sich bei dem genannten Parameter um die Ladung der Membranoberfläche handelt, da die Bestimmung der molekularen Aktivität von BetP in *E. coli*-Zellen und die TC-Stimulierung in *C. glutamicum*-Zellen durchgeführt wurden. Der Parameter, der sich bei der Plasmamembran einer Zelle und der Proteoliposomenmembran signifikant unterscheidet, ist die Proteinkonzentration in der Phospholipiddoppelschicht. Während das höchste PLV in BetP-Proteoliposomen bei 1:30 und in den meisten Fällen bei 1:60 lag, beträgt das PLV in einer Zelle im Durchschnitt 1:1 (Alberts *et al.*, 2002). Ein derart hoher Proteinanteil in der Membran könnte vermutlich einen Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften der Phospholipiddoppelschicht haben und u.a. den Parameter beeinflussen, welcher die stimulierende Wirkung auf BetP hat. Die physikalischen Modelle, die für die Berechnung unterschiedlicher Membranparameter wie z.B. des Lateraldrucks eingesetzt werden, sollen zumindest qualitativ korrekt sein, wenn die Lipidmembran wenig oder kein Protein enthält. Allerdings soll der Einfluss der Proteine auf den Membrandruck in diese Berechnungen integriert werden, um die Lipid-bedingte Modulierung der Proteinfunktion umfassend beschreiben zu können (Cantor, 1999). Um zu überprüfen, ob ein hoher Proteinanteil in der Membran den Aktivierungszustand von BetP beeinflussen könnte, müsste die molekulare Aktivität von BetP in Proteoliposomen mit einem PLV von >1:5 bestimmt werden. Ebenfalls sollte die TC-bedingte Aktivierung von BetP in solchen Vesikeln analysiert werden. Diese Kontrollversuche sind jedoch nicht durchführbar, weil die hohe Proteinkonzentration in Proteoliposomen die Vesikel für Ionen undicht machen würde. Eine alternative Hypothese, die den vollaktivierten Zustand der BetP in Proteoliposomen erklären könnte, ist eine Veränderung der BetP-Struktur bei der Rekonstitution des

Diskussion

Transporters in Liposomen. Bei der Solubilisierung von BetP aus der Plasmamembran könnte der Transporter in der Protein-Detergens-Mizelle eine andere Konformation als in der nativen Membran annehmen. Bei der Reintegration von BetP aus der Protein-Detergens-Mizelle in die Liposomenmembran könnte die native Konformation möglicherweise nicht vollständig wiederhergestellt werden. Beispielsweise könnten beim Detergensentzug durch die Polystyrol-Kügelchen nicht alle Detergensmoleküle entfernt werden, besonders die aus der zentralen Kavität zwischen den BetP-Protomeren. Diese residualen Tenside könnten mit BetP-Regionen interagieren, die in der Plasmamembran mit Phospholipiden wechselwirken oder die Protein-Protein-Wechselwirkungen stören und den Transporter in die Konformation zwingen, die von der nativen abweicht. Eine nicht-native Proteinkonformation könnte theoretisch dazu führen, dass BetP *in vitro* durch die Erhöhung der internen K^+ -Konzentration ähnlich wie in Zellen, die hochosmotischen Bedingungen ausgesetzt sind, stimuliert wird. Für diese Hypothese gibt es jedoch keine experimentellen Beweise.

5. Zusammenfassung

Der sekundär aktive Glycinbetaintransporter BetP aus *Corynebacterium glutamicum* zeichnet sich zusätzlich durch die Eigenschaften eines Sensors und eines Regulators aus. In den Zellen reagiert das Protein bei der Steigerung der externen Osmolalität mit der Beschleunigung der Betaintransportrate. Ein ähnliches Verhalten wird auch bei in Liposomen rekonstituiertem BetP beobachtet. Allerdings ließ sich die BetP-Aktivierung in Vesikeln nach ausführlichen Experimenten nur auf die Zunahme der internen K^+ -Konzentration (auch von Rb^+ und Cs^+) zurückführen. Die BetP-Stimulierung durch die Erhöhung der intrazellulären K^+ -Konzentration wurde ebenfalls in *C. glutamicum*-Zellen nachgewiesen und in dieser Arbeit ausführlich untersucht. Die seit langer Zeit vermutete Interaktion von BetP mit K^+ wurde mithilfe der Röntgenkristallographie bestätigt, nachdem K^+ in BetP-Kristallen durch Rb^+ ersetzt wurde und mehrere an BetP spezifisch gebundene Rb^+ -Ionen detektiert wurden. Dies implizierte auch die K^+ -Bindung an diesen Positionen. Für die Bindung von K^+ an BetP wurde ein Hill-Koeffizient von ca. 5 berechnet, was auf den stark kooperativen Charakter der Interaktion hinweist. Allerdings sind wahrscheinlich nicht alle Rb^+/K^+ unmittelbar an der BetP-Stimulierung beteiligt. Möglicherweise dient ein Teil der BetP- K^+ -Interaktionen der Stabilisierung der Proteinstruktur, während die anderen Ionen eine aktivierende Wirkung auf BetP haben.

Obwohl die interne K^+ -Konzentration eine wichtige Rolle bei der BetP-Stimulierung spielt, gibt es einen alternativen Stimulus, der von BetP perzipiert werden kann. Durch die differenzierte Stimulierung von BetP in *C. glutamicum*-Zellen konnte demonstriert werden, dass der K^+ -abhängige Stimulus für die vollständige BetP-Aktivierung nicht hinreichend ist. Erst wenn Zellen mit einer hohen internen K^+ -Konzentration hochosmotischen Bedingungen ausgesetzt werden, erreicht BetP die höchste Transportaktivität. Ebenfalls konnte BetP durch die amphipathische Verbindungen Tetracain und Lysophosphatidylcholin aktiviert werden, besonders bei niedrigosmotischen Bedingungen. Da sowohl osmotisch aktive Solute als auch die Insertion der amphipathischen Moleküle die Veränderung des lateralen Druckprofils einer Phospholipiddopelschicht verändern können, ist die Perzeption der Membrandruckänderung als zweiter Stimulus durch BetP wahrscheinlich. Der alternative Stimulus verstärkt offensichtlich den BetP-aktivierenden Effekt von K^+ . Es wurde auch in früheren Arbeiten

Zusammenfassung

vorgeschlagen, dass der alternative BetP-Stimulus mit der Veränderung der physikalischen Parameter und der Fettsäurezusammensetzung der Membran assoziiert ist.

Der Nachweis des alternativen Stimulus, der für die vollständige BetP-Stimulierung in Zellen erforderlich ist, warf die Frage nach dem Aktivierungszustand von BetP in Proteoliposomen auf. Dank den beiden in dieser Arbeit etablierten Methoden, konnte die molekulare Aktivität des Transporters bestimmt werden. Die immunologische Bestimmung der BetP-Konzentration in Zellextrakten von *E. coli* sowie eine neuartige Methode zur Abschätzung des Anteils der aktiven BetP-Moleküle in Proteoliposomen ermöglichte die Berechnung der Wechselzahl von BetP *in vivo* und *in vitro*. Die molekulare Aktivität von BetP in Proteoliposomen und in Zellen bei voller Stimulierung war vergleichbar hoch. Außerdem war die Auswirkung von TC auf die BetP-Aktivität in Proteoliposomen und in *C. glutamicum*-Zellen, die einem hyperosmotischen Schock ausgesetzt wurden, sehr ähnlich. Aufgrund dieser Ergebnisse ist BetP *in vitro* vollständig aktiviert, was wiederum bedeutet, dass der zweite Stimulus in Vesikeln präsent sein muss, obwohl es zurzeit keine offensichtliche Erklärung für dieses Phänomen gibt.

6. Abkürzungsverzeichnis

AHT	Anhydrotetrazyklin
ATCC	American type culture collection
BCCT-Familie	Betain-Choline-Carnitin-Transporter-Familie
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
CL	Cardiolipin
BHI-Medium	Brain Heart Infusion-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPG	Dioleyl-phosphatidylcholin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kDa	Kilo-Dalton
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
K _{1/2}	Ligandenkonzentration bei halbmaximaler Aktivität
KP _i	Kalium-Phosphat-Puffer
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LPC	Lysophosphatidylcholin
LS	Lauroylsarcosin
MFS	<i>major facilitator superfamily</i>
NaP _i	Natrium-Phosphat-Puffer
NBT	Nitro-Blau-Tetrazolium
NC	Nitrocellulose
n _H	Hill-Koeffizient
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600nm
pBetP	BetP plamid-kodiert synthetisiert
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PLV	Protein/Lipid-Massenverhältnis
PI	Phosphatidylinositol
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
pNP	para-Nitrophenol

Abkürzungsverzeichnis

POPG	Phosphatidyl-oleyl-phosphatidylcholin
PVDF	Polyvenylidendifluorid
RT	Raumtemperatur
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
TC	Tetracain
U	Unit; Einheit der Enzymaktivität [$\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$]
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
V_{max}	Maximale Transportaktivität
ZTM	Zelltrockenmasse

7. Literaturverzeichnis

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., (2002). The Lipid Bilayer, in: Molecular Biology of the Cell. Garland Science.

Andersen, O.S., Sawyer, D.B., Koeppe, R.E., (1992). Modulation of channel function by the host bilayer., in: Gaber, B.P., Easwaran, K.R.K. (Eds.), Biomembrane Structure and Function. Adenine Press, Schenectady, NY, pp. 227–244.

Auger, M., Jarrell, H.C., Smith, I., Siminovitch, D.J., Mantsch, H.H., Wong, P., (1988). Effects of the local anesthetic tetracaine on the structural and dynamic properties of lipids in model membranes: a high-pressure Fourier transform infrared study. *Biochemistry* 27, 6086–6093.

Becker, M., Börngen, K., Nomura, T., Battle, A.R., Marin, K., Martinac, B., Krämer, R., (2013). Glutamate efflux mediated by *Corynebacterium glutamicum* MscCG, *Escherichia coli* MscS, and their derivatives. *Biochimica et biophysica acta* 1828, 1230–40.

Biemans-Oldehinkel, E., Mahmood, N., Poolman, B., (2006). A sensor for intracellular ionic strength. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 10624–9.

Blunden, G., El Barouni, M.M., Gordon, S.M., McLean, W.F.H., Rogers, D.J., (1981). Extraction, Purification and Characterisation of Dragendorff-positive Compounds from Some British Marine Algae. *Botanica Marina* 24, 451–456.

Booth, I., Edwards, M., Black, S., Schumann, U., Miller, S., (2007). Mechanosensitive channels in bacteria: signs of closure? *Nature reviews. Microbiology* 5, 431–40.

Booth, I.R., (1985). Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological reviews* 49, 359–78.

Botzenhardt, J., (2004). Regulation des Betaintransporters BetP aus *Corynebacterium glutamicum* während der Anpassung an hyperosmotischen Stress. Universität zu Köln.

Literaturverzeichnis

- Boyd, N.D., Cohen, J.B., (1984).** Desensitization of membrane-bound *Torpedo* acetylcholine receptor by amine noncompetitive antagonists and aliphatic alcohols: studies of [³H]acetylcholine binding and ²²Na⁺ ion fluxes. *Biochemistry* 23, 4023–33.
- Bremer, E., Krämer, R., (2000).** Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria, in: Storz, G.T., HenggeAronis, R. (Eds.), *Bacterial Stress Responses*. ASM : Blackwell Science, Washington, DC, pp. 79–97.
- Brown, A.D., (1976).** Microbial water stress. *Bacteriological reviews* 40, 803–46.
- Cantor, R.S., (1997)a.** New Concepts in Biochemistry The Lateral Pressure Profile in Membranes : A Physical Mechanism of General Anesthesia. *Biochemistry* 36.
- Cantor, R.S., (1997)b.** Lateral Pressures in Cell Membranes: A Mechanism for Modulation of Protein Function. *The Journal of Physical Chemistry B* 101, 1723–1725.
- Cantor, R.S., (1999).** The influence of membrane lateral pressures on simple geometric models of protein conformational equilibria. *Chemistry and Physics of Lipids* 101, 45–56.
- Cayley, S., Record, M.T., (2003).** Roles of cytoplasmic osmolytes, water, and crowding in the response of *Escherichia coli* to osmotic stress: biophysical basis of osmoprotection by glycine betaine. *Biochemistry* 42, 12596–609.
- Culham, D., Henderson, J., Crane, R., Wood, J., (2003).** Osmosensor ProP of *Escherichia coli* responds to the concentration, chemistry, and molecular size of osmolytes in the proteoliposome lumen. *Biochemistry* 42, 410–20.
- Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmid, R., Bakker, E.P., (1988).** Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Archives of Microbiology* 150, 348–357.
- Farwick, M., Siewe, R.M., Krämer, R., (1995).** Glycine betaine uptake after hyperosmotic shift in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology* 177, 4690–4695.
- Follmann, M., Becker, M., Ochrombel, I., Ott, V., Krämer, R., Marin, K., (2009).** Potassium transport in *Corynebacterium glutamicum* is facilitated by the putative channel

Literaturverzeichnis

protein CglK, which is essential for pH homeostasis and growth at acidic pH. *Journal of bacteriology* 191, 2944–52.

Galinski, E.A., Trüper, H.G., (1994). Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 15, 95–108.

Gibson, N.J., Brown, M.F., (1993). Lipid headgroup and acyl chain composition modulate the MI-MII equilibrium of rhodopsin in recombinant membranes. *Biochemistry* 32, 2438–2454.

Gruner, S.M., (1991). Lipid membrane curvature elasticity and protein function., in: Peliti, L. (Ed.), *Biologically Inspired Physics*. Plenum Publishing Corp., New York, pp. 127–135.

Hecker, M., Völker, U., (2001). General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Advances in microbial physiology* 44, 35–91.

Hénin, J., Shinoda, W., Klein, M.L., (2009). Models for phosphatidylglycerol lipids put to a structural test. *The journal of physical chemistry. B* 113, 6958–63.

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

Hoischen, C., Krämer, R., (1990). Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of bacteriology* 172, 3409–16.

Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H., (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23–28.

Keller, S.L., Bezrukov, S.M., Gruner, S.M., Tate, M.W., Vodyanoy, I., Parsegian, V.A., (1993). Probability of alamethicin conductance states varies with nonlamellar tendency of bilayer phospholipids. *Biophysical journal* 65, 23–7.

Kitagawa, N., Oda, M., Totoki, T., (2004). Possible Mechanism of Irreversible Nerve Injury Caused by Local Anesthetics. *Anesthesiology* 100, 962–967.

Koch, A.L., (1983). The surface stress theory of microbial morphogenesis. *Advances in microbial physiology* 24, 301–66.

Literaturverzeichnis

Krämer, R., Klingenberg, M., (1977). Reconstitution of adenine nucleotide transport with purified ADP, ATP-carrier protein. *FEBS Letters* 82, 363–367.

Krämer, R., Klingenberg, M., (1979). Reconstitution of adenine nucleotide transport from beef heart mitochondria. *Biochemistry* 18, 4209–15.

Kyhse-Andersen, J., (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of biochemical and biophysical methods* 10, 203–9.

Laemmli, U.K., (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

Lambert, C., Erdmann, A., Eikmanns, M., Kramer, R., (1995). Triggering Glutamate Excretion in *Corynebacterium glutamicum* by Modulating the Membrane State with Local Anesthetics and Osmotic Gradients. *Applied and environmental microbiology* 61, 4334–42.

Landfald, B., Strøm, A.R., (1986). Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 165, 849–55.

Laver, D.R., Van Helden, D.F., (2011). Three independent mechanisms contribute to tetracaine inhibition of cardiac calcium release channels. *Journal of molecular and cellular cardiology* 51, 357–69.

Leung, Y.W., Rawal, B.D., (1977). Mechanism of Action of Tetracaine Hydrochloride against *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Infectious Diseases* 136, 679–683.

Ley, O., (2001). No Title Bedeutung der Prolinbiosynthese bei der Osmoregulation von *Corynebacterium glutamicum*. Universität zu Köln.

Maingret, F., (2000). Lysophospholipids Open the Two-pore Domain Mechano-gated K⁺ Channels TREK-1 and TRAAK. *Journal of Biological Chemistry* 275, 10128–10133.

Mantipragada, S.B., Horváth, L.I., Arias, H.R., Schwarzmann, G., Sandhoff, K., Barrantes, F.J., Marsh, D., (2003). Lipid-protein interactions and effect of local anesthetics in acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata* electric organ. *Biochemistry* 42, 9167–75.

Literaturverzeichnis

Marsh, D., (1990). Handbook of Lipid Bilayers. CRC Press Inc.

Martinac, B., Adler, J., Kung, C., (1990). Mechanosensitive ion channels of *E. coli* activated by amphipaths. Nature 348, 261–3.

McGadey, J., (1970). A tetrazolium method for non-specific alkaline phosphatase. Histochemie 23, 180–184.

McLaggan, D., Naprstek, J., Buurman, E.T., Epstein, W., (1994). Interdependence of K⁺ and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*. The Journal of biological chemistry 269, 1911–7.

Miller, J., (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.

Ochrombel, I., Ott, L., Krämer, R., Burkovski, A., Marin, K., (2011). Impact of improved potassium accumulation on pH homeostasis, membrane potential adjustment and survival of *Corynebacterium glutamicum*. Biochimica et biophysica acta 1807, 444–50.

Ott, V., (2008). Der Regulationsmechanismus des Osmosensors BetP aus *Corynebacterium glutamicum*. Universität zu Köln.

Ott, V., Koch, J., Späte, K., Morbach, S., Krämer, R., (2008). Regulatory properties and interaction of the C- and N-terminal domains of BetP, an osmoregulated betaine transporter from *Corynebacterium glutamicum*. Biochemistry 47, 12208–18.

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

Özcan, N., Ejsing, C.S., Shevchenko, A., Lipski, A., Morbach, S., Krämer, R., (2007). Osmolality, temperature, and membrane lipid composition modulate the activity of betaine transporter BetP in *Corynebacterium glutamicum*. Journal of Bacteriology 189, 7485–7496.

Özcan, N., Krämer, R., Morbach, S., (2005). Chill Activation of Compatible Solute Transporters in *Corynebacterium glutamicum* at the Level of Transport Activity. Journal of Bacteriology 187, 4752–4759.

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

Peter, H., Burkovski, A., Krämer, R., (1998)a. Osmo-sensing by N- and C-terminal extensions of the glycine betaine uptake system BetP of *Corynebacterium glutamicum*. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 2567–2574.

Peter, H., Weil, B., Burkovski, A., Krämer, R., Morbach, S., (1998)b. *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. *Journal of Bacteriology* 180, 6005–6012.

Petrache, H.I., Dodd, S.W., Brown, M.F., (2000). Area per lipid and acyl length distributions in fluid phosphatidylcholines determined by ²H NMR spectroscopy. *Biophysical journal* 79, 3172–92.

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

Ressl, S., Terwisscha Van Scheltinga, A.C., Vorrhein, C., Ott, V., Ziegler, C., (2009). Molecular basis of transport and regulation in the Na⁺/betaine symporter BetP. *Nature* 458, 47–52.

Rigaud, J.L., Pitard, B., Levy, D., (1995). Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1231, 223–46.

Romantsov, T., Stalker, L., Culham, D.E., Wood, J.M., (2008). Cardiolipin controls the osmotic stress response and the subcellular location of transporter ProP in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 283, 12314–23.

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

Literaturverzeichnis

- Rösgen, J., (2007).** Molecular basis of osmolyte effects on protein and metabolites. *Methods in enzymology* 428, 459–86.
- Rübenhagen, R., (2001).** Der Glycinbetain-Transporter BetP aus *Corynebacterium glutamicum* als Osmosensor. Universität zu Köln.
- Rübenhagen, R., Morbach, S., Krämer, R., (2001).** The osmoreactive betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* is a sensor for cytoplasmic K. *The European Molecular Biology Organization Journal* 20, 5412–5420.
- Rübenhagen, R., Rönsch, H., Jung, H., Krämer, R., Morbach, S., (2000).** Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 735–41.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T., (1989).** *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schaffner, W., Weissmann, C., (1973).** A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Analytical Biochemistry* 56, 502–514.
- Schiller, D., (2004).** Osmosensorische Eigenschaften des Glycinbetain-Transporters BetP aus *Corynebacterium glutamicum*. Universität zu Köln.
- Schiller, D., Ott, V., Krämer, R., Morbach, S., (2006).** Influence of membrane composition on osmosensing by the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum*. *The Journal of biological chemistry* 281, 7737–46.
- Schiller, D., Rübenhagen, R., Krämer, R., Morbach, S., (2004).** The C-terminal domain of the betaine carrier BetP of *Corynebacterium glutamicum* is directly involved in sensing K⁺ as an osmotic stimulus. *Biochemistry* 43, 5583–5591.
- Schmidt, T., Koepke, J., Frank, R., Skerra, A., (1996).** Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *Journal of molecular biology* 255, 753–66.
- Söderlund, T., Alakoskela, J., Pakkanen, A., Kinnunen, P., (2003).** Comparison of the effects of surface tension and osmotic pressure on the interfacial hydration of a fluid phospholipid bilayer. *Biophysical journal* 85, 2333–41.

Literaturverzeichnis

- Steger, R., (2002).** Vergleichende Studien zur Aktivitätsregulation osmosensitiver Transporter aus *Corynebacterium glutamicum*. Universität zu Köln.
- Steger, R., Weinand, M., Krämer, R., Morbach, S., (2004).** LcoP, an osmoregulated betaine/ectoine uptake system from *Corynebacterium glutamicum*. FEBS letters 573, 155–60.
- Sukharev, S., Blount, P., Martinac, B., Blattner, F., Kung, C., (1994).** A large-conductance mechanosensitive channel in *E. coli* encoded by *mscL* alone. Nature 368, 265–8.
- Tauch, A., Kirchner, O., Löffler, B., Götter, S., Pühler, A., Kalinowski, J., (2002).** Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. Current microbiology 45, 362–7.
- Tsatskis, Y., Khambati, J., Dobson, M., Bogdanov, M., Dowhan, W., Wood, J., (2005).** The osmotic activation of transporter ProP is tuned by both its C-terminal coiled-coil and osmotically induced changes in phospholipid composition. The Journal of biological chemistry 280, 41387–94.
- Van der Heide, T., Stuart, M.C., Poolman, B., (2001).** On the osmotic signal and osmosensing mechanism of an ABC transport system for glycine betaine. The EMBO journal 20, 7022–32.
- Voss, S., 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 engineering 10, 975–82.
- White, G., Racher, K., Lipski, A., Hallett, F., Wood, J., (2000).** Physical properties of liposomes and proteoliposomes prepared from *Escherichia coli* polar lipids. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1468, 175–186.
- Wolf, A., Krämer, R., Morbach, S., (2003).** Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and their significance in response to osmotic stress. Molecular Microbiology 49, 1119–1134.
- Wood, J.M., (1999).** Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR 63, 230–62.

Literaturverzeichnis

Wood, J.M., (2006). Osmosensing by bacteria. *Sciences STKE signal transduction knowledge environment* 2006, 43.

Danksagung

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Krämer danke ich für die Überlassung eines interessanten Themas, für die intensiven und produktiven Besprechungen, seine Hilfe bei der Entwicklung neuer Methoden und seine stets positive, motivierende Einstellung.

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

Ich danke meinen ehemaligen Betreuern Dr. Vera Ott und Dr. Sascha Nicklisch, die mich in die Welt von BetP eingeführt haben.

Unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Christine Ziegler und Dr. Camilo Perez danke ich für die interessanten Diskussionen und ihre Hilfe bei der Untersuchung des K^+ -abhängigen Stimulus.

Ich danke den Mitgliedern unserer kleinen Osmo-Gang Sascha, Michael alias „Michiko“ und Markus alias „Genosse Becker“ für die harmonische - wenn auch nicht immer geordnete - Zusammenarbeit, wertvollen Ratschläge, lebhaften Diskussionen zu allen möglichen Themen und generell für die tolle Stimmung in unserem Kollektiv.

Ich danke außerdem allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Krämer, die ich kennengelernt habe, für eine sehr angenehme Atmosphäre, stetige Hilfsbereitschaft und zahlreiche Aktivitäten außerhalb der Arbeitszeiten. Ich werde all das sehr vermissen, wenn ich diese AG verlassen werde. Ich bezweifle, dass ich ein solches Arbeitsklima nochmal erleben werde.

Ein großer Dank geht an meine Eltern und meine Freundin Christina, für ihre Hilfe, Unterstützung und Geduld.

Erklärung

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.

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

Datum: Köln, Mai 2013

Unterschrift:

Lebenslauf

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Stanislav Maximov
Geburtsdatum: 06.04.1983
Geburtsort: Vladimir, Russland
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Adresse: An der Pulvermühle 18, 51105 Köln

Schulbildung:

1990-1999 Linguistisches Gymnasium Nr. 23, Vladimir
1999-2004 Genoveva-Gymnasium, Köln
Abschluss: Abitur

Studium:

10.2004-09.2009 Studium der Biologie an der Universität zu Köln
Abschluss: Diplom

Stipendium:

10.2009-03.2012 Stipendiat der IMPRS (International Max-Planck Research School), MPIZ Köln

Promotion:

10.2009-07.2013 Promotion im Rahmen der International Max-Planck Research School am Institut für Biochemie der Universität zu Köln
Arbeitsgruppe: Prof. Dr. R. Krämer