

Forschungszentrum Jülich



Institut für Biotechnologie

***Funktion und Regulation mechanosensitiver
Efflux-Systeme für kompatible Solute in
Corynebacterium glutamicum***

Susanne Ruffert

***Funktion und Regulation mechanosensitiver
Efflux-Systeme für kompatible Solute in
Corynebacterium glutamicum***

Susanne Ruffert

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3621

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-3621

D38 (Diss. Universität Köln)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Function and regulation of mechanosensitive efflux systems for compatible solutes in *C. glutamicum*

Under conditions of low osmolality cells are exposed to massive water influx. In response to sudden hypoosmotic stress, the gram positive soil bacterium *Corynebacterium glutamicum* releases low-molecular-mass solutes to maintain constant turgor pressure. The systems that mediate the efflux process have been studied.

Upon osmotic downshock, the cells preferentially released compatible solutes such as glycine betaine and proline. Release of lysine and glutamate was restricted and ATP was totally retained. The cells maintained relative high cytoplasmic potassium concentrations. Several results suggest that the efflux is channel mediated. First, the efflux was extremely fast reaching an efflux rate of $6000 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g dm}^{-1}$ or higher. Second, efflux was insensitive to the addition of external substrate. It was also unchanged after uncoupling by CCCP. A continuous decrease of external osmolarity leads to a continuous efflux of compounds. This also effects the energetic situation of the cells.

The existence of mechanosensitive channels in the cytoplasmic membranes of *C. glutamicum* could be demonstrated using patch-clamp techniques. Fragments of the plasma membrane were fused into giant liposomes. Application of suction in the pipette revealed the presence of two types of high conductance mechanosensitive channels that were voltage-independent and could be inhibited by gadolinium. Both channels were characterized by their slow kinetics, their weak cationic selectivity, and differed only by their conductance (600-700 pS and 1200-1300 pS in 0.1 M KCl), raising the possibility that they might correspond to different oligomers of the same subunit. Since their discovery in bacteria it has been proposed that mechanosensitive channels play a physiological role in sensing and/or adapting to changing osmotic environments. The involvement of these channels in the shock-induced release of compatible solutes in *C. glutamicum* is discussed.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
Osmotische Eigenschaften von Zellen	1
Osmoregulation unter hyperosmotischem Streß	3
Osmoregulation unter hypoosmotischen Streß.....	4
Mechanosensitive Kanäle.....	6
Ziel der Arbeit.....	9
2. Material und Methoden.....	10
2.1 Chemikalien	10
2.1.1 Synthese von [¹⁴ C]-Glycinbetain	10
2.2 Bakterienstämme und Plasmide	11
2.3 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	11
2.3.1 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen für <i>C. glutamicum</i>	11
2.3.2 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen für <i>E. coli</i>	13
2.4 Bestimmung des Efflux kompatibler Solute	13
2.4.1 Silikonölzentrifugation.....	13
2.4.2 Messung des Glycinbetain- und Prolin- Efflux.....	14
2.4.2.1 Efflux nach hypoosmotischem Schock.....	14
2.4.2.2 Efflux nach kontinuierlicher Senkung der externen Osmolalität	15
2.4.2.3 Efflux unter Einwirkung des Inhibitors Gadolinium	15
2.4.3 Bestimmung von Lysin, Alanin, Glutamat und Ectoin.....	16
2.4.4 Bestimmung der internen Na ⁺ - und K ⁺ -Konzentrationen	17
2.4.5 ATP-Bestimmung	17
2.4.6 Hochauflösende ¹ H-NMR Spektroskopie zur Bestimmung von Ectoin	18
2.5 Bestimmung des Cytoplasmavolumens.....	19
2.6 Bestimmung des Membranpotentials.....	20
2.7 Elektrophysiologische Untersuchungen.....	20
2.7.1 Membranpräparation aus <i>C. glutamicum</i>	20
2.7.2 Bestimmung des Proteingehalts	21
2.7.3 Bestimmung der NADH-Oxidase-Aktivität.....	21
2.7.4 Herstellung von <i>giant liposoms</i>	21
2.7.5 Elektrophysiologische Messungen.....	23
2.8 Molekularbiologische Methoden	24

2.8.1	Techniken zur DNA-Rekombination.....	24
2.8.2	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	24
2.8.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	25
2.8.4	Transformation von <i>E. coli</i>	25
2.8.5	Polymerase-Kettenreaktion	25
2.8.5.1	Herstellung der Oligonukleotide	25
2.8.5.2	Durchführung der PCR	26
2.8.6	Sequenzierung von DNA und Sequenzanalyse	27
2.8.7	Southern-Blot-Hybridisierung.....	27
3.	Ergebnisse	29
3.1	Biochemische Untersuchungen des hypoosmotisch induzierten Effluxsystems in <i>C. glutamicum</i>	29
3.1.1	Abhängigkeit des cytoplasmatischen Volumens von der externen Osmolalität.....	29
3.1.2	Kinetik des Efflux kompatibler Solute.....	29
3.1.3	Regulation des Efflux.....	32
3.1.3.1	Regulation des Efflux auf Aktivitätsebene.....	32
3.1.3.2	Regulation der Expression.....	38
3.1.4	Der osmotisch induzierte Efflux erfolgt über Kanäle, nicht über Carrier- Proteine	39
3.1.5	Die Spezifität der hypoosmotischen Efflux-Kanäle.....	42
3.1.5.1	Efflux der kompatiblen Solute	43
3.1.5.2	Efflux anderer Aminosäuren	48
3.1.5.3	Efflux von Na ⁺ und K ⁺	51
3.1.6	Die Wirkung von Gadolinium	55
3.2	Energetische Konsequenzen des Osmolyt-Effluxes für die Zellen.....	57
3.3	Versuche zur Isolierung des Gens für den großen mechanosensitiven Kanal MscL	60
3.4	Elektrophysiologische Untersuchung mechanosensitiver Kanäle in <i>C. glutamicum</i>	62
3.4.1	Isolierung und Charakterisierung von Membranfragmenten aus <i>C. glutamicum</i>	63
3.4.2	Identifizierung der mechanosensitiven Kanäle der Cytoplasmamembran von <i>C. glutamicum</i>	64
3.4.3	Spannungsabhängigkeit und Ionenselektivität der mechanosensitiven Kanäle	68
3.4.4	Inhibierung der Kanalaktivität mit Gd ³⁺	71

4. Diskussion.....	73
4.1 Biochemische Untersuchung des hypoosmotisch aktivierten Effluxsystems in <i>C. glutamicum</i>	73
Kanal- oder <i>Carrier</i> - Mechanismus.....	73
Regulation des Efflux	75
Die Spezifität des hypoosmotisch aktivierten Efflux.....	75
Energetische Konsequenz des hypoosmotisch stimulierten Efflux	77
4.2 Elektrophysiologische Untersuchung der mechanosensitiven Kanäle in der Cytoplasmamembran von <i>C. glutamicum</i>	78
Die Eigenschaften der mechanosensitive Kanäle in <i>C. glutamicum</i>	79
Der molekulare Ursprung der mechanosensitive Kanäle in <i>C. glutamicum</i>	80
5. Zusammenfassung.....	83
6. Literatur.....	85

Verwendete Abkürzungen:

ATP	Adenosin-Mono-/Di-/Tri-Phosphat
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine, Rinderserumalbumin
C	Konzentration
CCCP	Carbonylcyanid-m-Chlorophenylhydrazon
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
Ect	Ectoin
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
GB	Glycinbetain
GRASP	Gradient-accelerated Spectroscopy
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
LB	Luria Bertani
MK	Mechanosensitive Kanäle
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid oxidiert/reduziert
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
NMR	Nuclear Magnetic Resonanz, Kernresonanzspektroskopie
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ppm	parts per million, Teile pro Million
Pro	Prolin
R	Allgemeine Gaskonstante
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssp.	Subspecies
t	Tonnen
T	Temperatur
TM	Trockenmasse
TPP	Tetraphenylphosphoniumbromid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSP	Natrium-3-Trimethylsilyl-[2,2',3,3'-D ₄]-Propionat
(v/w)	Gewicht pro Volumen
Upm	Umdrehungen pro Minute

1. Einleitung

Das 1957 von Kinoshita *et al.* isolierte und charakterisierte *Corynebacterium glutamicum* gehört zu den Gram-positiven, nicht-sporenbildenden Bodenbakterien. Den Gattungsnamen erhielten sie aufgrund ihrer keulenartigen Form. Wirtschaftliche Bedeutung erlangten die Bakterien durch die Eigenschaft, Glutamat zu exkretieren, von der sich auch ihr Artnamen ableitet. Diese Aminosäure findet als Geschmacksverstärker in der Lebensmittelindustrie Verwendung. Mit Hilfe molekularbiologischer und biotechnologischer Methoden gelang es, mit *C. glutamicum* auch andere Aminosäuren im großen Maßstab zu produzieren. So konnten Stämme und Verfahren entwickelt werden, mit denen z.B. die für Vertebraten essentielle Aminosäure L-Lysin, ein Futtermitteladditiv, gebildet wird (Krämer, 1993). Gegenwärtig werden durch Fermentation von *C. glutamicum* jährlich mehr als 700.000 t L-Glutamat sowie über 300.000 t L-Lysin gewonnen.

Sowohl im natürlichen Habitat als auch unter Fermentationsbedingungen können Situationen entstehen, in denen die Zellen von *C. glutamicum* einem starken osmotischen Streß ausgesetzt sind. Während des Fermentationsprozesses kommt es in der Kulturbrühe zu einem massiven Anstieg der Osmolalität des Mediums, die bis zu 2000 mOsmol/ kg betragen kann (Krämer, persönliche Mitteilung). Im Boden sorgen abwechselnde Trocken- und Feuchtperioden für starke osmotische Schwankungen, die z.B. bei einem plötzlich einsetzenden Regenschauer extrem schnell erfolgen können. Die Fähigkeit, sich an Fluktuationen der externen Osmolalität anpassen zu können, ist fundamental für das Überleben dieser Organismen. Ein reibungsloser Zell-Metabolismus ist auf relativ konstante Bedingungen im Bezug auf pH, Ionenzusammensetzung und Metabolit- Gehalt angewiesen (Csonka und Hanson, 1991). Deshalb müssen die Zellen mit effektiven Systemen ausgerüstet sein, die sie befähigen, auf osmotischen Streß schnell zu reagieren. Diese aktive Reaktion wird mit dem Begriff "Osmoregulation" bezeichnet.

Osmotische Eigenschaften von Zellen

Osmotischer Streß entsteht durch die Konzentrationsdifferenz der in Wasser gelösten Teilchen im Cytoplasma und in dem die Zellen umgebenden Medium. Mit steigender Osmotikum-Konzentration sinkt das Wasserpotential (Ψ_w = Potential des Lösungsmittels) einer Lösung, während ihr osmotisches Potential (Ψ_π = Potential des Osmotikums, zum Wasserpotential komplementär) steigt. Bei geeigneter Verdünnung ergibt sich nach Van't Hoff für das osmotische Potential folgende vereinfachte Beziehung:

$$\Psi_{\pi} = R \cdot T \cdot \sum C$$

wobei R die allgemeine Gaskonstante, T die absolute Temperatur und C die Konzentration der gelösten Teilchen darstellt. Die durch die Konzentrationsdifferenz entstandene Potentialdifferenz über der Cytoplasmamembran strebt gemäß des 2. Hauptsatzes der Thermodynamik einen Ausgleich an. Aufgrund der Semipermeabilität der Membran kommt es dabei nicht zu einem Stoff-, sondern zu einem Wasserfluß über die Membran, da diese eine wirksame osmotische Barriere darstellt. Während sie für Wasser und einige kleine, unpolare Moleküle gut permeabel ist, werden Ionen und größere Substanzen zurückgehalten. Das Wasser fließt bei den osmotischen Vorgängen immer in Richtung des niedrigeren Wasserpotentials. Dieser einseitig gerichtete Diffusionsvorgang von Wasser wird Osmose genannt. Den Wassermolekülen wird die Diffusion durch die Anwesenheit von spezifischen Poren, den sogenannten Aquaporinen, erleichtert. Diese speziellen Membranproteine, die zuerst in Erythrocyten und danach in vielen anderen tierischen und pflanzlichen Zellen gefunden wurden, sind weit verbreitet (Chrispeels und Agre, 1994). Untersuchungen zeigten, daß 64-75 % des Wassertransportes von Aquaporinen vermittelt wird, bei osmotisch getriebenem Wassertransport stieg dieser Anteil sogar auf 85 % (Henzler und Steudle, 1995; Mathai *et al.*, 1995). 1995 konnte der erste bakterielle Wasserkanal, AqpZ, in *E. coli* identifiziert werden (Calamita *et al.*, 1995). Es wird vermutet, daß auch *C. glutamicum* spezifische Poren für den Wassertransport besitzt, da beobachtet wurde, daß die Wasserpermeabilität der Zellmembranen mit $HgCl_2$ signifikant gesenkt werden konnte (Schoberth, persönliche Mitteilung).

Unter physiologischen Bedingungen ist die zellinterne Osmolalität (d.h. die Konzentration der osmotisch wirksamen Teilchen, mol/ kg) höher als die externe Osmolalität. Dem daraufhin einströmenden Wasser stellt sich bei Pflanzen- und Bakterienzellen der Druck der Zellwand (Turgordruck) entgegen, gegen die die Cytoplasmamembran gedrückt wird. Gleichen sich Druckpotential (Ψ_p) und osmotisches Potential aus, kann kein Wasser mehr in die Zellen eindringen, das Wasserpotential ist gleich Null:

$$\begin{aligned} \Psi_w &= \Psi_{\pi} + \Psi_p; \\ \text{wenn } \Psi_{\pi} &= \Psi_p, \\ \text{dann } \Psi_w &= 0 \end{aligned}$$

Für Gram-positive Bakterien beträgt der Turgordruck etwa 20 bar (Csonka, 1989), während Gram-negative Bakterien einen deutlich geringeren Turgordruck von 2-3 bar aufweisen (Imhoff, 1986). Unter Osmoregulation wird die Aufrechterhaltung von Zellvolumen und

Turgordruck, die für eine reibungslose Zellfunktion und -teilung erforderlich sind, unter wechselnden osmotischen Bedingungen verstanden (Brown *et al.*, 1986). Dabei unterscheidet man zwischen der Regulation unter hyperosmotischem und unter hypoosmotischem Streß.

Osmoregulation unter hyperosmotischem Streß

Hyperosmotischer Streß entsteht, wenn die Osmotikum-Konzentration in den Zellen geringer ist als im Medium. In diesem Fall ist das Wasserpotential in den Zellen im Gegensatz zum Außenmedium erhöht, Wasser strömt aus den Zellen und sie drohen zu dehydrieren. Um dem Verlust von Turgor und Cytoplasmavolumen entgegenzuwirken, erhöhen die Zellen die cytoplasmatische Konzentration osmotisch aktiver Substanzen, entweder durch Aufnahme oder durch deren *de novo* Synthese. Die osmoprotektiven Substanzen werden auch kompatible Solute genannt, da sie die zellulären Prozesse nicht weiter beeinträchtigen (Brown und Simpson, 1972). Zu ihnen zählen Zucker, z.B. Saccharose und Trehalose, Polyole, hauptsächlich Glycerol und Arabitrol, Aminosäuren, wie Glutamat und Prolin, sowie Glycinbetain, Ectoin und Carnitin (vergl. Abb. 1). Häufig tritt unter hyperosmotischen Bedingungen auch die Aufnahme von K^+ auf. Galinski und Trüper (1994) unterscheiden bei den unterschiedlichen Anpassungsstrategien zwischen dem KCl-Typ oder dem kompatible Solute- bzw. organischen Osmolyt-Typ. Während Halobakterien und halophile Eubakterien zu den KCl-Typen zählen, die sehr hohe interne K^+ -Konzentrationen von bis zu 6,5 M KCl tolerieren können, erfolgt bei den übrigen Bakterien keine oder nur eine vorübergehende K^+ -Akkumulation, wie z.B. bei *Escherichia coli*. Die Gram-negativen Bakterien akkumulieren als initiale Antwort auf einen hyperosmotischen Schock K^+ -Ionen zusammen mit Glutamat, die im Verlauf der osmotischen Anpassung durch die kompatible Solute Glycinbetain und Prolin ersetzt werden (Csonka, 1989, Csonka und Hansen, 1991; Cayley *et al.*, 1992). Als Langzeitosmotikum wird vor allem Trehalose genutzt (Dinnbier *et al.*, 1988).

C. glutamicum akkumuliert unter hyperosmotischen Bedingungen zunächst Na^+ (Guillouet und Engasser, 1995a), gefolgt von Prolin, Glycinbetain, Glutamin, Glutamat, Trehalose und Ectoin (Frings *et al.*, 1993; Farwick *et al.*, 1995; Skjerdal *et al.*, 1996). Die Aminosäuren und Trehalose können von den Zellen synthetisiert werden, Glycinbetain und Ectoin müssen aufgenommen werden (Frings *et al.*, 1993; Farwick *et al.*, 1995). Die Aufnahme wird allerdings im Vergleich zur Synthese bevorzugt. Während eines längeren Adaptationsprozesses steigt der interne Glycinbetain-Pool in Anwesenheit dieses kompatiblen Soluts im Medium auf Kosten von Glutamin, Glutamat und Trehalose (Skjerdal *et al.*, 1996). Der gleiche Effekt ist auch mit Prolin beobachtet worden (Guillouet und Engasser, 1995b; Skjerdal *et al.*, 1996).

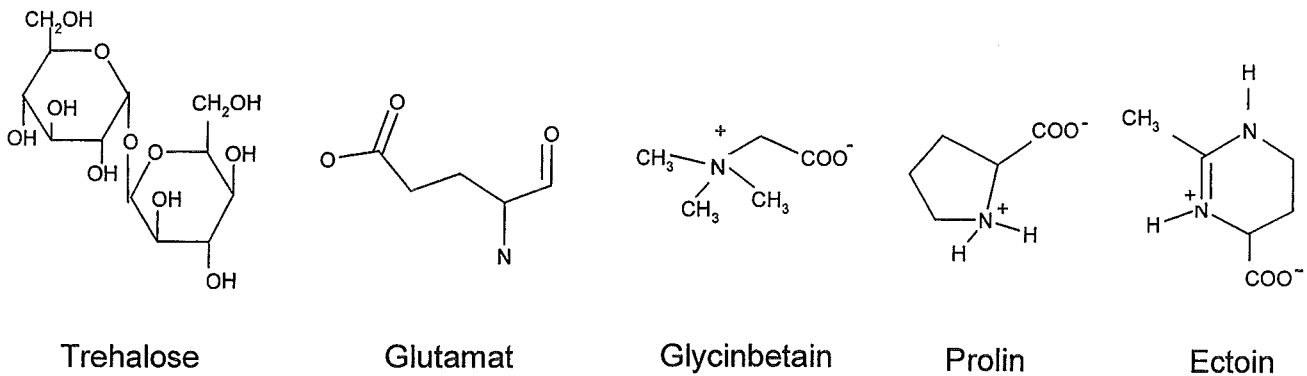


Abb. 1: Beispiele für häufig auftretende kompatible Solute.

C. glutamicum besitzt vier Aufnahmesystem für kompatible Solute, BetP, EctP, ProP und PutP (Abb. 2), die ersten drei sind osmotisch reguliert (Peter, 1997). BetP, ein hochspezifisches, sekundäres Aufnahmesystem, transportiert Glycinbetain im Symport mit zwei Na^+ -Ionen und wird sowohl auf Expressionsebene als auch auf Aktivitätsebene osmotisch reguliert (Farwick *et al.*, 1995; Peter *et al.*, 1996; Peter *et al.*, 1997b). Die beiden anderen osmotisch regulierten Aufnahmesysteme, ProP und EctP, sind nicht so spezifisch wie BetP. ProP nimmt Prolin und Ectoin, vermutlich im Symport mit Protonen, EctP sogar alle drei von *C. glutamicum* bevorzugten kompatiblen Solute im Symport mit Na^+ -Ionen auf (Peter, 1997). Das vierte Aufnahmesystem, PutP, nimmt ausschließlich Prolin im Symport mit Na^+ -Ionen auf und wird konstitutiv exprimiert. Es wird nicht osmotisch reguliert und dient vermutlich zur Prolin-Bereitstellung für den Zell-Metabolismus (Peter *et al.*, 1997a). Die Aufnahmesysteme sind sehr effektiv. Sie sind in der Lage, die kompatiblen Solute bis zu einer Konzentration von 1 M und höher im Cytoplasma anzuhäufen (Frings *et al.*, 1993) und diese extrem hohe *steady-state*-Konzentration entgegen einem mehr als 10^6 -fachen Gradienten aufrecht zu erhalten (Farwick *et al.*, 1995).

Osmoregulation unter hypoosmotischen Bedingungen

Unter hypoosmotischen Bedingungen ist die Konzentration osmotisch wirksamer Teilchen in den Zellen höher als im Medium. Dies kann, je nach Potenzialgefälle, zu einem massiven Wassereinstrom führen (Abb. 3). Der damit einhergehende Volumenanstieg droht, die Zellen zum Platzen zu bringen. Sie schützen sich vor dieser gefährlichen Situation mit der Freisetzung der in den Zellen gelösten niedermolekularen Substanzen, also der kompatiblen

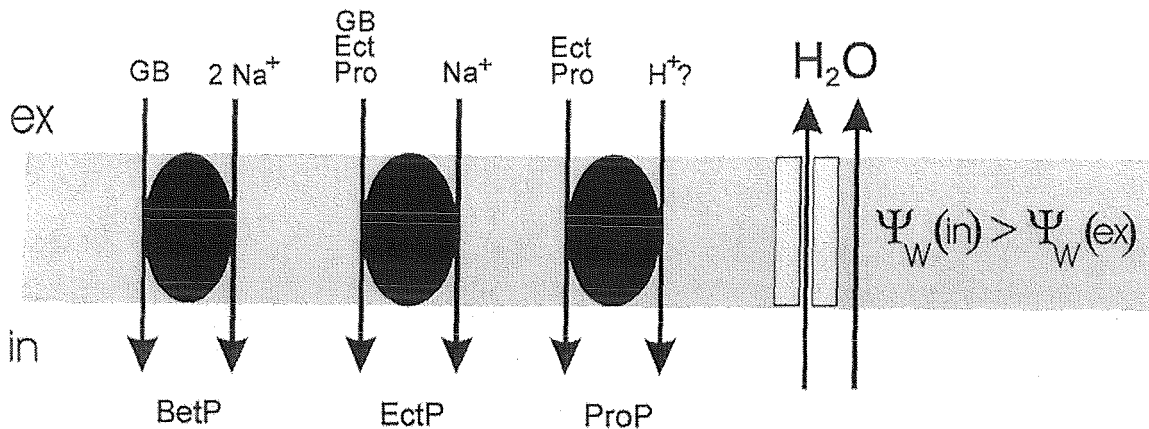


Abb. 2: Hyperosmotische Regulation in *C. glutamicum*. Ist das Wasserpotential in den Zellen höher als im Medium, tritt Wasser über die Membran oder durch Wasserkanäle aus. Um den Turgordruck wiederherzustellen, nimmt *C. glutamicum* mit den spezifischen Transportproteinen BetP, PutP und ProP kompatible Solute aus dem Medium auf. Diese können bis zu sehr hohen Cytoplasma-Konzentrationen akkumuliert werden.

Solute, die sie unter hyperosmotischen Bedingungen akkumuliert haben. Während die Aufnahme der kompatiblen Solute gut untersucht ist, ist über ihren Efflux unter hypoosmotischem Streß wenig bekannt. Bei moderatem hypoosmotischem Schock verlieren die Bakterien in einem spezifischen Prozeß zunächst bevorzugt kompatible Solute. Der unter diesen Bedingungen beobachtete Efflux erwies sich als unabhängig von den hyperosmotisch regulierten Aufnahmesystemen (Schleyer *et al.*, 1993; Koo *et al.*, 1991; Lamark *et al.*, 1992). Bei starkem hypoosmotischem Streß werden auch andere niedermolekulare Substanzen in einem unspezifischen Effluxprozeß freigesetzt (Tsapis und Kepes, 1977). Es kann sogar zum Efflux von großen und für die Zelle wichtigen Molekülen wie ATP kommen (Berrier *et al.*, 1992). Der Transportweg der ausgeschleusten Substanzen ist nicht bekannt. Im Allgemeinen werden mechanosensitive Kanäle mit dem hypoosmotisch induzierten Efflux in Verbindung gebracht (s. u.). Es gibt allerdings Hinweise, daß das Ausschleusen kompatibler Solute nach hypoosmotischem Streß auch durch Transport-Proteine vermittelt wird. So wurde bei *Salmonella typhimurium* ein relativ langsamer Efflux von Glycinbetain (Koo *et al.*, 1991), bei *E. coli* von Glycinbetain und Cholin (Lamark *et al.*, 1992) als auch von Trehalose beobachtet (Styrvoid und Strøm, 1991). In *Lactobacillus plantarum* setzt unmittelbar nach hypoosmotischem Schock ein schneller Efflux von kompatiblen Soluten ein, vermutlich durch Kanalaktivität vermittelt, der gefolgt wird von einem langsamen Transportprozeß, der einem Carrier-Mechanismus zugeschrieben wird (Glaasker *et al.*, 1996). Bei *C. glutamicum* wurde beobachtet, daß der Carrier-vermittelte Glutamat-Transport durch Veränderungen des osmotischen Gradienten beeinflusst werden kann (Lambert *et al.*, 1995).

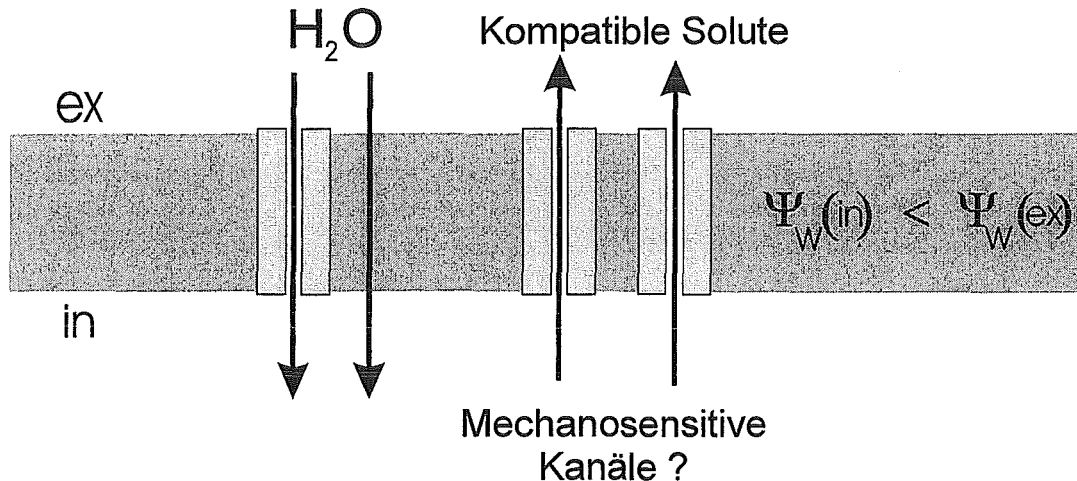


Abb. 3: Hypoosmotische Regulation in *C. glutamicum*. Als Reaktion auf den osmotischen Wassereinstrom unter diesen Bedingungen entlassen die Zellen die vorher akkumulierten kompatiblen Solute. Die beteiligten Effluxsysteme sind noch nicht näher charakterisiert.

Mechanosensitive Kanäle

Unter dem Begriff "mechanosensitive Kanäle" faßt man Kanäle zusammen, die durch mechanischen Druck auf die Membran entweder aktiviert oder inaktiviert werden. Ihre Öffnungswahrscheinlichkeit wird bei elektrophysiologischen Messungen durch Anbringen einer Saugspannung beeinflusst. Mechanosensitive Kanäle bilden eine eigene Klasse und unterscheiden sich von Kanälen, die durch Spannung oder Ligandenbindung geöffnet werden. Seit ihrer Entdeckung in embryonalen Skelettmuskelzellen von Hühnern 1984 durch Guharay und Sachs sind sie in vielen unterschiedlichen tierischen, pflanzlichen, Pilz- und Bakterien-Zellen nachgewiesen worden (Martinac, 1993; Morris, 1990; Sackin, 1995). Mechanosensitive Kanäle sind in Gram-negativen und Gram-positiven Organismen identifiziert worden (Martinac *et al.*, 1987; Zoratti und Petronilli, 1988; Berrier *et al.*, 1989), die am besten untersuchten dehnungsaktivierten Kanäle sind die aus der Cytoplasmamembran von *E. coli*.

Es gibt zwei verschiedenen Möglichkeiten, die Kanäle der im Durchschnitt 1-2 μm großen Bakterienzellen elektrophysiologisch untersuchen zu können (Sukharev *et al.*, 1997). Zum einen können *E. coli*- Zellen durch enzymatische Unterdrückung der Zellteilung zu über-großen Protoplasten, sogenannten Sphaeroplasten aufgebläht werden. Mit diesen Zellen sind Messungen der Kanäle an der nativen Membran möglich. (Martinac *et al.*, 1987; Berrier

et al., 1996). Zum anderen können Fragmente der Bakterienmembranen mit Liposomen zu Proteoliposomen fusioniert, und in einem Rehydratations-/Dehydratationszyklus auf die für *patch-clamp*-Messungen benötigte Größe gebracht werden (Berrier *et al.*, 1989). Diese Proteoliposomen werden auch *giant liposomes* genannt. Der Vorteil dieser Methode ist, daß bei Gram-negativen Organismen zwischen den Kanälen der inneren und äußeren Membran unterschieden werden kann.

Zunächst wurde bei Messungen an *E. coli*-Sphaeroplasten ein mechanosensitiver Kanal beobachtet, der sich durch eine große Leitfähigkeit auszeichnete, spannungsabhängig und leicht anionenselektiv war (Martinac *et al.*, 1987). Zu Anfang war unklar, ob sich der Kanal in der periplasmatischen oder cytoplasmatischen Membran befand, und ob weitere Zellkomponenten, wie z.B. Lipoproteine oder die Peptidoglycanschicht zu seiner Funktion benötigt wurden (Martinac *et al.*, 1990; Kubalski *et al.*, 1993). Durch weitere Untersuchungen an *E. coli*-Sphaeroplasten sowie an Proteoliposomen wurde deutlich, daß *E. coli* verschiedene Typen mechanosensitiver Kanäle besitzt, die sich durch ihre Leitfähigkeit, ihre Ionenselektivität und ihre Öffnungskinetik unterscheiden und in der Cytoplasmamembran lokalisiert sind (Berrier *et al.*, 1989, Sukharev *et al.*, 1993; Berrier *et al.*, 1996). Berrier *et al.* (1996) unterteilten die von ihnen gemessenen Kanäle in 3 Gruppen, die aufgrund des Zeitpunktes ihrer Entdeckung folgende Nomenklatur erhielten: a) **MscL** (L für Large); zu ihnen werden alle Kanäle mit „großen“ Leitfähigkeiten oberhalb von 950 pS gerechnet; b) **MscS** (S für Small); dazu zählen Kanäle mit den „mittleren“ Leitfähigkeiten 300 pS und 500 pS, und schließlich c) **MscM** (M für Mini); dazu zählen Kanäle mit „kleinen“ Leitfähigkeiten von 50-200 pS. Die Bezeichnungen „groß“, „mittel“ und „klein“ sind dabei relativ und haben nur innerhalb dieser Gruppe von Kanälen ihre Bedeutung. Verglichen mit anderen Ionenkanälen sind selbst die Leitfähigkeiten der MscM noch verhältnismäßig groß (Hamill, 1983; Sachs, 1983).

Die mechanosensitiven Kanäle in *E. coli* scheinen in Clustern angeordnet vorzuliegen, da in fast allen *patches* an Proteoliposomen immer nur eine Sorte von Kanälen zu beobachten war (Berrier *et al.*, 1996). Bei *patches* an der nativen Membran erschienen die Kanäle bei kontinuierlich erhöhtem Druck in der Reihenfolge ihrer Leitfähigkeiten. Während MscM und MscS eine langsame Öffnungskinetik aufweisen, sind die MscL durch ein schnelles Öffnen und Schließen der Kanäle, ein sogenanntes „Flickern“, gekennzeichnet. Die druckempfindlichen Kanäle unterscheiden sich ebenfalls hinsichtlich ihrer Ionenselektivität. Die „großen“ Kanäle sind gar nicht selektiv, die „mittleren“ Kanäle schwach anionenselektiv und die „kleinen“ Kanäle schwach kationenselektiv. MscS sowie MscL konnten im *patch clamp*-Experiment durch das dreiwertige Lanthanoid Gadolinium (Gd^{3+}), einen bekannten Inhibitor mechanosensitiver Kanäle (Yang und Sachs, 1989; Hamill und McBride, 1996), gehemmt

werden, wobei die Hemmung der MscS durch Verstärkung des Drucks wieder aufgehoben werden konnte (Sukharev *et al.*, 1993).

1994 gelang es Sukharev *et al.*, das Gen für den großen mechanosensitiven Kanal, *mscL*, zu klonieren. Es codiert für ein 136 Aminosäuren großes Protein mit einem sehr hydrophoben Kern, das keinerlei Ähnlichkeiten zu bislang bekannten Proteinen zeigt (Sukharev *et al.*, 1994). Dieses Protein war in zellfreien Systemen vollständig aktiv. Damit war nachgewiesen, daß die mechanosensitiven Kanäle keine weiteren Komponenten zur Aktivität benötigen (Sukharev *et al.*, 1994, Häse *et al.*, 1995). Topologie- und Fusionsstudien führten zu einem Modell, bei dem das Protein aus zwei transmembranen Domänen besteht, wobei C- und N-Terminus ins Cytoplasma reichen. Die ausgedehnte periplasmatische Struktur ist, wie Mutationsversuche belegen, für eine normale Kanalöffnung essentiell (Blount *et al.*, 1996a, 1996b; 1996c). Während diese Studien zu dem Fazit kommen, daß ein funktionierender Kanal grundsätzlich aus sechs Untereinheiten besteht, gelangt eine andere Untersuchung von Häse *et al.* (1997) zu dem Schluß, daß die Proteine in der Hauptsache als Monomere in der Membran vorliegen, und nur eine kleine Anzahl von Molekülen als Dimere oder höhere Multimere vorliegen (Häse *et al.*, 1997). Darin sahen die Autoren eine Erklärung für das Auftreten der unterschiedlichen Leitfähigkeiten bei den einzelnen Messungen. Durch eine verbesserte Rekonstitutierungsmethode konnte reines MscL-Protein aus *E. coli* gewonnen werden, das sich im *patch-clamp*-Experiment hinsichtlich der Leitfähigkeit und der Druckempfindlichkeit vollständig funktionstüchtig zeigte und mit dem zweidimensionale Kristalle erhalten werden konnten (Saint *et al.*, 1998). Aus Analysen dieser Kristalle im Elektronenmikroskop ging hervor, daß sich das Protein tatsächlich als Homohexamer in der Membran organisiert. MscL ist in einer großen Anzahl von Bakterien gefunden worden (Moe *et al.*, 1998). Die anderen bakteriellen mechanosensitiven Kanäle, im Speziellen MscS und MscM aus *E. coli*, sind bislang noch nicht isoliert worden, die korrespondierenden Gene sind noch unbekannt.

Die mutmaßlichen physiologischen Funktionen, die die mechanosensitiven Kanälen erfüllen sollen, sind so weitgefächert wie ihr Auftreten (Morris, 1995). Seit ihrer Entdeckung in Bakterien wird vermutet, daß sie dort eine Rolle bei der Erkennung von osmotischem Streß und/oder bei der Anpassung an diesen spielen (Martinac *et al.*, 1987, Kung *et al.*, 1990). Da unter hypoosmotischen Bedingungen Veränderungen der Membranspannung, bedingt durch erhöhten Turgordruck, auftreten, wurde vermutet, daß mechanosensitive Kanäle an den osmotischen Reaktionen der Zellen beteiligt sind. Einen ersten Hinweis darauf lieferten die Beobachtungen von Berrier *et al.* (1992), daß sowohl der hypoosmotische Efflux bei *E. coli* als auch die MscL-Aktivität im elektrophysiologischen Experiment durch Gd^{3+} gehemmt werden kann. Einen direkten Nachweis für die Beteiligung mechanosensitiver Kanäle bei der Osmoregulation in Bakterien lieferte die Beobachtung, daß die Aktivität mechanosensitiver

Kanäle von *E. coli*- und *Bacillus subtilis*- Proteoplasten im *patch-clamp*- Experiment nicht nur durch angelegten Druck auf die Membran, sondern auch durch osmotischen Streß ausgelöst werden kann. In *E. coli* führt die Deletion des *mscL* Gens zwar nicht zu einer Beeinträchtigung des Osmolyt-Efflux, jedoch wird das kleine Protein Thioredoxin, das sonst während des Schocks ausgeschleust wird, durch die Deletion zurückgehalten (Ajouz *et al.*, 1998). Das zeigt zum einen, daß MscL während des hypoosmotischen Schocks geöffnet ist. Daraus folgt aber auch, daß sich die anderen Kanäle, MscM und MscS, bei hypoosmotischem Schock ebenfalls öffnen. Alle drei unterschiedlichen Kanaltypen scheinen ein redundantes System zu bilden, das eine Rolle bei der Osmoregulation spielt.

Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll das hypoosmotisch induzierte Effluxsystem von *C. glutamicum* hinsichtlich seiner Funktion und Regulation untersucht werden. Es wird eine Beteiligung mechanosensitiver Kanäle vermutet. Biochemische Untersuchungen sollen über die Kinetik des hypoosmotisch aktivierten Efflux, seine Spezifität, Inhibierbarkeit und seine Regulation sowohl auf Aktivitätsebene als auch auf Expressionsebene Aufschluß geben. In einem molekularbiologischen Ansatz soll versucht werden, die Gene der an dem Efflux beteiligten Proteine zu identifizieren. Da vermutet wird, daß der hypoosmotisch aktivierte Efflux von mechanosensitiven Kanälen vermittelt wird, soll untersucht werden, ob *C. glutamicum* solche Kanäle besitzt und welche Eigenschaften diese aufweisen. Zur Charakterisierung der mechanosensitiven Kanäle sollen elektrophysiologische Untersuchungen an Membranfragmenten von *C. glutamicum* vorgenommen werden. Mit dieser Methode können Informationen über die Leitfähigkeit, die Öffnungskinetik und über die Selektivität der mechanosensitiven Kanäle erhalten werden, die im Vergleich mit den bekannten Daten anderer bakterieller mechanosensitiver Kanäle aufschlußreich sein können.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Chemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Amersham International, Buckinghamshire, GB:

[¹⁴C]-Cholin (55mCi/ mmol), [¹⁴C]-Carboxyinulin (210 mCi/ mmol),
[¹⁴C]- Glutaminsäure (266 mCi/ mmol), [¹⁴C]-Tetraphenylphosphoniumbromid
(TPP), [³H]₂O (5 mCi/ mmol)

Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg, D:

L-Lysinyl-L-Alanin-Dipeptid (L-Lys-Ala)

Difco Laboratories, Detroit, USA:

Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Brain-Heart-Infusion-Medium, Brain-Heart-
Infusion-Agar, Hefe-Extrakt

Hartmann Analytical GmbH, Braunschweig, D:

[¹⁴C]-Prolin (246 mCi/ mmol)

Millipore, Eschborn, D:

Glasfaserfilter Typ F, Porengröße 0,45 µm

Sigma, Deisenhofen, D:

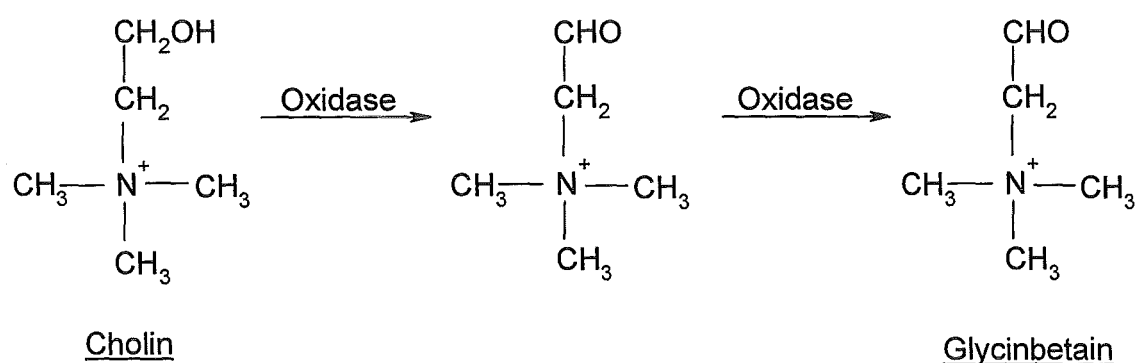
Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP), Valinomycin, Kanamycin,
Carbenicillin, Asolectin (Typ IV-S)

Ectoin wurde freundlicherweise von Prof. E. A. Galinski, Münster, zur Verfügung gestellt. Radioaktives Glycinbetain wurde selbst synthetisiert (vergl. 2.1.1).

Hier nicht aufgeführte Chemikalien wurden alle von den Firmen Sigma (Deisenhofen, D), Merck (Darmstadt, D) oder Boehringer (Mannheim, D) in p.A. Qualität bezogen.

2.1.1 Synthese von [¹⁴C]-Glycinbetain

Markiertes Glycinbetain wurde nach einer Methode von Landfald und Strøm (1986) ausgehend von [¹⁴C]-Cholin synthetisiert. Dabei wird Cholin mittels zweifacher Oxidation durch Cholin-Oxidase aus *Alcaligenes spec.* zu Glycinbetain umgesetzt:



250 μl [Methyl]- ^{14}C -Cholinchlorid (50 μCi) und 250 μl Cholinoxidase (30 U, in 100 mM NaH_2PO_4 , pH 8) wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 200 μl 0,7 M Perchlorsäure gestoppt. Die Reinigung des synthetisierten Glycinbetains erfolgte über eine Kationenaustauscher-Säule (Dowex 50 W x 8, $\varnothing$ 0,5 cm, Höhe 1 cm). Der Kationenaustauscher wurde durch Waschen mit 1 M HCl in die protonierte Form gebracht, pro Säule 150 μl Produktionslösung aufgetragen und mit je 2 ml 2 M $\text{NH}_3(\text{NH}_4\text{OH})$ eluiert. Die Eluate wurden durch Vakuum-Rotation bei 30 °C getrocknet und in insgesamt 0,5 ml H_2O *bidest.* aufgenommen. Die Reinheit des [^{14}C]-Glycinbetains wurde nach der Methode von Blunden *et al.* (1981) mittels Dünnschichtchromatographie (DC) kontrolliert. Nach einer Laufzeit von 6 h (Laufmittel 50:50 Methanol:Wasser, Merck Kieselgel TLC-Platten) wurde das Chromatogramm mit einem DC-Scanner (Automatic TLC-Linear Analyser, Berthold, Bad Wildbad) oder über Filmentwicklung nach 14-tägiger Inkubation ausgewertet.

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *E. coli* und *C. glutamicum* sowie deren Eigenschaften sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2 aufgelistet.

2.3 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

2.3.1 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen für *C. glutamicum*

Zur Stammhaltung der Zellen wurde Luria Bertani (LB)-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) verwendet. Zur Kultivierung und zur Durchführung der biochemischen Versuche wurden die Zellen in „Brain Heart Infusion“ (BHI)-Medium angezogen, dem zur Herstellung hyperosmotischer Wachstumsbedingungen 750 mM NaCl zugegeben wurde.

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete Stämme von *E. coli* und *C. glutamicum* und ihre Eigenschaften.

Stamm	Relevanter Geno-/Phänotyp	Referenz
<i>C. glutamicum</i>		
ATCC 13032	Wildtyp	Abe <i>et al.</i> , 1967
<i>E. coli</i>		
DH5 α <i>mcr</i>	<i>endA1 supE44 thi-lλ recA1 gyrA96 relA1</i> <i>deoR</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 <i>mcrA</i> Δ (<i>mcr hsdRMS mcrB</i>)	Grant <i>et al.</i> , 1990

Tab. 2: Verwendete Plasmide und ihre Eigenschaften.

Plasmide	Marker/Eigenschaften	Referenz
pUC19	Ap ^R , ColE1 ori	Vieira & Messing, 1982

Zur Anzucht von Flüssigkulturen wurde das Medium in Reagenzgläsern (5 ml) oder in 0,5 l Erlenmeyerkolben mit seitlichen Schikanen (100 ml) mit Zellen von einer frischen Stammpatte beimpft und über Nacht bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler (130 Upm) inkubiert. Für die Herstellung von Agarplatten wurde 15 g/ l Agar getrennt autoklaviert und danach dem jeweiligen Medium zugegeben. Die Inkubation der Zellen auf Agarplatten erfolgte ebenfalls über Nacht bei 30 °C. Das Zellwachstum wurde photometrisch bestimmt, indem die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen wurde. Eine OD₆₀₀ = 1 entspricht 0,34 mg Trockenmasse/ ml. Alle Stämme wurden auf Vollmedium-Agarplatten bei 4 °C gelagert und monatlich auf frische Platten übertragen.

Zur Permeabilisierung der Zellen von *C. glutamicum* für die Versuche mit dem Inhibitor Gd³⁺ erfolgte die Anzucht in 0,5 l Erlenmeyerkolben mit 100 ml LB-Medium, das zusätzlich die Zellwandmodifikatoren und Wachstumsinhibitoren Glycin (2,5 %) und Isonicotinsäurehydrazid (0,4 %) enthielt sowie 750 mM NaCl für hyperosmotische Wachstumsbedingungen.

2.3.2 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen für *E. coli*

Die Kultivierung der Zellen von *E. coli* erfolgte stets in LB-Vollmedium, entweder als Flüssigkultur (vergl. 2.3.1) oder auf Agarplatten bei 37 °C. Für Plasmid-Minipräparationen wurden *E. coli*-Zellen in 5 ml LB-Röhrchen angezogen, denen Carbenicillin zwischen 25-50 mg/ ml zugegeben wurde.

Die Bereitstellung von kompetenten Zellen erfolgte nach einer Methode von Inoue *et al.* (1990). DH5 α *mcr*-Zellen wurden aus einer LB-Übernachtskultur in 250 ml SOB-Medium überimpft, das folgende Zusammensetzung aufwies: 20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 2 g NaCl, 2,5 ml 1 M KCl, H₂O *bidest. ad* 1 l. Nach dem Autoklavieren wurden noch 5 ml einer sterilen 2 M MgCl₂-Lösung zugegeben. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 angezogen. Von diesem Zeitpunkt an wurden alle weiteren Schritte bei 4 °C durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen 10 min auf Eis gekühlt, durch Zentrifugation bei 1250 g (Eppendorf 5810R, Eppendorf, Hamburg, D) geerntet und in 80 ml TB (10 mM Pipes, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, pH 6 mit KOH einstellen, danach Zugabe von 55 mM MnCl₂, anschließende Sterilfiltration) resuspendiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, wobei das Volumen des Puffers auf 20 ml eingeengt wurde. Nach tropfenweiser Zugabe von 1,4 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) und anschließender 10 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen á 200 bzw. 400 μ l aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4 Bestimmung des Efflux kompatibler Solute

2.4.1 Silikonölzentrifugation

Zur Bestimmung der internen und externen Konzentration kompatibler Solute wurden die Zellen mittels Silikonölzentrifugation schnell und vollständig vom umgebenden Medium abgetrennt und in 20 % Perchlorsäure inaktiviert (Klingenberg und Pfaff, 1967). Dazu wurden Proben einer Zellsuspension (100-200 μ l) zu definierten Zeitpunkten entnommen und in Beckman-Reaktionsgefäße (300 μ l) mit übereinander liegenden Schichten von 30 μ l 20 %iger Perchlorsäure und 65 μ l Silikonöl überführt. Je nach Dichte des benutzten Mediums wurde die Dichte des verwendeten Silikonöls variiert. Enthielten die Puffer NaCl, wurde Öl der Dichte $\rho = 1,04$ kg/ l eingesetzt, war Sorbitol die osmotisch aktive Substanz, wurde Silikonöl mit folgenden Dichten verwendet: $\rho = 1,04$ Kg/ l (0,25 M bis 0,4 M Sorbitol), $\rho = 1,07$ kg/ l (0,6 M und 0,8 M Sorbitol) und $\rho = 1,11$ kg/ l (> 0,8 M Sorbitol). Aufgrund des Dichteunterschieds zwischen Zellen und umgebenden Kulturmedium wandern die Zellen bei der nachfolgenden Zentrifugation der Reaktionsgefäße (30 s in einer Beckman Mikrofuge bei

maximaler Geschwindigkeit) durch die Silikonölschicht, während das Medium im Überstand verbleibt. Die extrazellulären Konzentrationen der untersuchten Substanzen konnten direkt aus den zellfreien Überständen gemessen werden. Für die Bestimmung der internen Konzentrationen mußten die Zellextrakte aufgearbeitet werden.

Zur Bestimmung von nicht radioaktiv markierten Soluten wurden die Zellsedimente nach Durchtrennung der Reaktionsgefäße in der Ölschicht in 500 µl Eppendorf-Reaktionsgefäße zentrifugiert. Durch Beschallung im Ultraschallbad (15 min) wurde eine vollständige Extraktion der Zellen gewährleistet. Durch Zugabe von 10 µl Silikonöl mit einer Dichte von $\rho = 1,1 \text{ kg/l}$ wurde die Dichte des mitgeschleppten Silikonöls erhöht. Nach Neutralisierung und Pufferung der Extrakte mit 25 µl 5 M KOH und 1 M Triethanolamin wurde Kaliumperchlorat auf Eis präzipitiert. Nach einer Zentrifugation der Zellextrakte (5 min bei 17 000 g in einer Eppendorfsentrifuge) konnte der Gehalt der untersuchten Substanz im Überstand bestimmt werden.

Zur Bestimmung von radioaktiv markierten Stoffen wurden die Zellsedimente nach Durchtrennung der Reaktionsgefäße in der Ölschicht in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen zentrifugiert. Nach Zugabe von 750 µl H₂O wurden die Extrakte 5 min im Ultraschallbad behandelt. Nach erneuter Zentrifugation (bei 17 000 g in einer Eppendorfsentrifuge) wurde die Konzentration der radioaktiven Substanzen in 650 µl des Überstands bestimmt.

2.4.2 Messung des Glycinbetain- und Prolin- Efflux

2.4.2.1 Efflux nach hypoosmotischem Schock

Zellen von *C. glutamicum* wurden mittels Zentrifugation (3 500 g; Eppendorf 5810R, Eppendorf, Hamburg, D) geerntet und zweimal mit 100 mM Mes/ Tris Puffer (pH 8; 8 °C) mit 5 mM Na₂HPO₄ und 5 mM K₂HPO₄ gewaschen. Zur Beladung der Zellen mit radioaktiv markiertem Glycinbetain bzw. Prolin wurden die Zellen bei einer OD₆₀₀ von 4 bei 30 °C in einem hyperosmotischen Puffer folgender Zusammensetzung inkubiert: Mes/ Tris 100 mM, pH 8; 0,9 M NaCl, 30 mM Glucose, 10 mM Harnstoff und 10 mM KCl. 5 Minuten nach Überführung der Zellen in den Beladungspuffer wurde entweder [¹⁴C]-Glycinbetain oder [¹⁴C]-Prolin in einer Gesamtkonzentration von 2 mM (ca. 0,02 µCi/ ml) zugesetzt. Nach 1 h Beladungszeit wurden die Zellen á 1,2 ml in Eppendorfgefäßen aliquotiert und bis zum weiteren Einsatz auf Eis gehalten.

Zur Bestimmung des Efflux wurden die Zellen zentrifugiert (3 min, 3 500 g) und in Mes/ Tris-Puffer resuspendiert. Dieser enthielt NaCl-Konzentrationen von 0,12 M bis 0,9 M (bzw. Sorbitol-Konzentrationen von 0,4 M bis 1,3 M), um unterschiedliche Osmolalitäten zu erzeugen. Die Gesamtosmolalität der jeweiligen Lösungen wurde kryoskopisch in einem Osmo-

meter (Osmomat 030 Gonotec GmbH, Berlin, D) gemessen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 200 µl-Proben entnommen und die Zellen mittels Silikonölzentrifugation vom umgebenden Medium getrennt. Die verbleibende Zellsuspension wurde mit 1 % (m/v) Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) aufgeschlossen. Die Radioaktivität des Überstands und der Gesamtfraction wurde mit einem Szintillationszähler (Rack-Beta 1214, LKB, Schweden) bestimmt, nachdem die Proben mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Canberra-Packard, Frankfurt a. M., D) versetzt worden waren.

2.4.2.2 Efflux nach kontinuierlicher Senkung der externen Osmolalität

Zur Messung des Glycinbetain-Efflux bzw. des Membranpotentials (s. 2.6) nach langsamer und kontinuierlicher Senkung der externen Osmolalität wurden 4 ml der Zellsuspension, die zuvor mit Glycinbetain oder mit [^{14}C]-Tetraphenylphosphoniumbromid (TPP^+ , vergl. 2.6) beladen worden war, unter Rühren in einem Becherglas bei einer Osmolalität von 1400 mOsm inkubiert (vergl. Abb. 4). Um die Osmolalität im Medium zu senken, wurde mit einer peristaltischen Pumpe kontinuierlich Puffer mit einer Osmolalität von 300 mOsm zugegeben. Die Menge an kontinuierlich zugegebenem und diskontinuierlich entnommenem Puffer wurde so ausbalanciert, daß die Zellsuspension während der gesamten Versuchsdauer ein annähernd konstantes Volumen aufwies. Zu den gewünschten Zeitpunkten wurden 200 µl Proben entnommen, im Szintillationszähler gezählt oder in die Silikonölzentrifugation eingesetzt. Durch die direkte Bestimmung der Radioaktivität der Proben konnte die Verdünnung und damit die Osmolalität der Probe zum Zeitpunkt der Entnahme akkurat bestimmt werden. Zur Bestimmung des Glycinbetain-Efflux bzw. des Membranpotentials wurde der interne und externe Glycinbetain-Gehalt bzw. TPP^+ -Gehalt der durch Zentrifugation separierten Proben gemessen.

2.4.2.3 Efflux unter Einwirkung des Inhibitors Gadolinium

Die Zellen wurden angezogen, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben geerntet, gewaschen und mit radioaktiv markiertem Glycinbetain beladen. Zur Bestimmung des Gd^{3+} -Effektes wurden die Zellen anschließend in unterschiedlich osmolalen NaCl-Puffern (vergl. 2.4.2.1) resuspendiert, die entweder 25 µM, 75 µM oder 250 µM Gd^{3+} enthielten. In einem zweiten Ansatz wurde der Inhibitor den Zellen bereits 3 min vor hypoosmotischem Schock zugegeben. Die Bestimmung des Gehalts an Glycinbetain in den Zellen und im Überstand wurde wie unter 2.4.2.1 beschrieben durchgeführt.

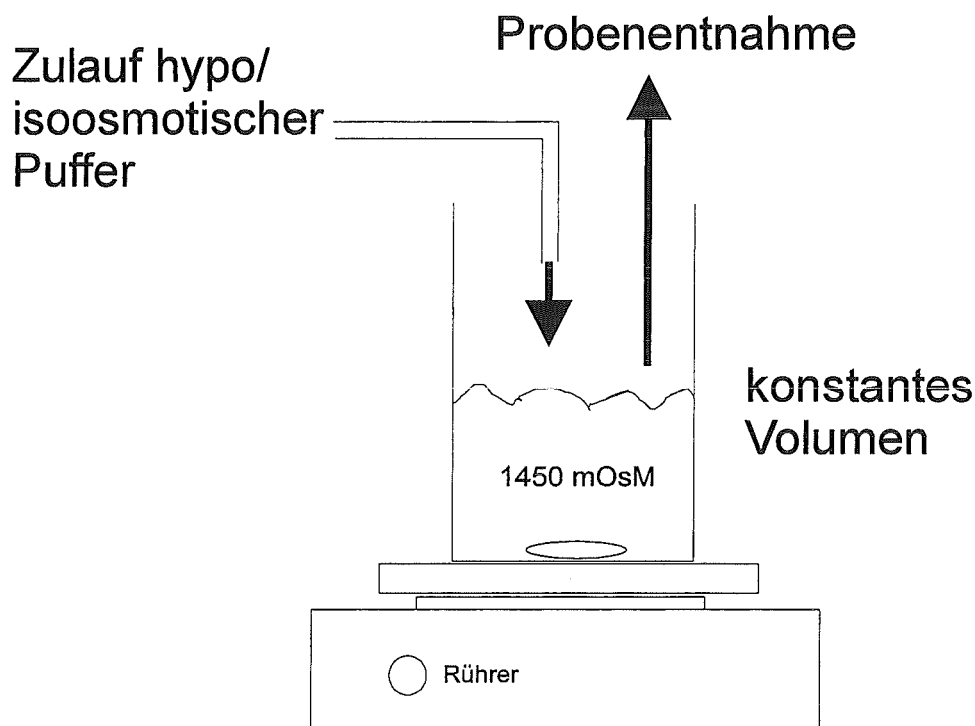


Abb. 4: Skizze zum Versuchsaufbau zur Messung des Glycinbetain-Efflux bzw. des Membranpotentials und der ATP- Konzentration bei kontinuierlicher Senkung der externen Osmolalität.

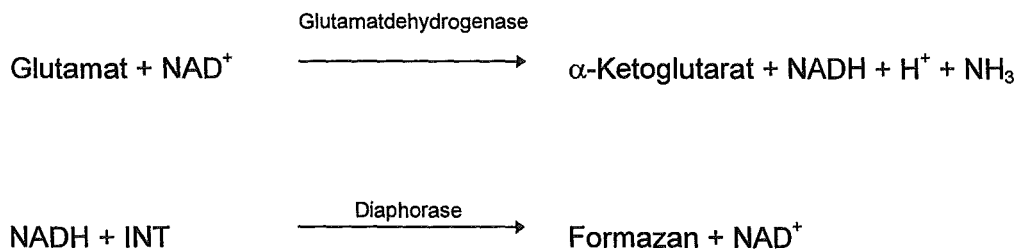
2.4.3 Bestimmung von Lysin, Alanin, Glutamat und Ectoin

Um Zellen von *C. glutamicum* mit Aminosäuren zu beladen, wurden sie wie unter 2.4.1 beschrieben geerntet, gewaschen und mit L-Lysiny-L-Alanin Dipeptid (1-5 mM) unter hyperosmotischen Bedingungen für 1 h in Anwesenheit von 2 mM Prolin oder Glycinbetain inkubiert.

Zur Bestimmung des Efflux von Lysin und Alanin wurde ihr Gehalt in den Zellen mittels *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) gemessen. Es wurde die HPLC-Anlage HP 1090 M (Hewlett-Packard, Waldbronn, D) mit angeschlossenen Fluoreszenzdetektor HP 1046 A verwendet. Die in den Proben enthaltenen Aminosäuren wurden der automatischen Vorsäulenderivatisierung mit 10 µl o-Phthalsäuredialdehyd/Borat/2-Mercaptoethanol-Reagenz (Pierce Europe, B.V. Oud-Beijerland, NL) unterzogen (Lindroth und Mopper, 1979). Die Auftrennung erfolgte über eine "reversed phase"-Säule RP-18 (Hypersil OD 18, 5 µm; Vorsäule: 20 x 4 mm, Hauptsäule 150 x 4 mm; CS-Chromatographie-Service GmbH, Langerwehe, D) bei 40 °C. Als mobile Phase wurde eine Mischung von Methanol und 0,1 M Natriumacetatpuffer pH 7,2 mit 0,06 % Natriumazid verwendet. Die Mischung änderte sich gemäß eines Gradientenprogramms. Als interner Standard wurde Ornithin eingesetzt. Die

Aminosäurekonzentration wurde anhand eines "externen Standards" (Eichmessung) bestimmt.

Die Menge an exkretiertem Glutamat wurde enzymatisch bestimmt (Beutler und Michael, 1974). Zum quantitativen Umsatz des Glutamats zu α -Ketoglutarat wurde die Glutamat-Dehydrogenase zusammen mit einem weiteren Enzym, der Diaphorase, eingesetzt. Letzteres Enzym überträgt die aus der oxidativen Deaminierung des Glutamats stammenden Reduktionsäquivalente auf Jodnitrotetrazolium-Violett (INT) unter Bildung eines gefärbten Formazans:



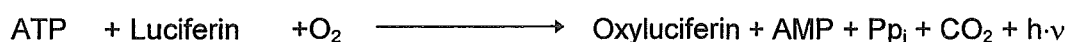
In den Test wurden 20 μl Überstand aus der Silikonölzentrifugation eingesetzt. Der photometrische Nachweis des gebildeten Formazans erfolgte bei 492 nm. Die Bestimmung des Ectoin-Gehalts der Proben erfolgte mittels NMR-Spektroskopie (vergl. 2.4.7).

2.4.5 Bestimmung der internen Na^+ - und K^+ -Konzentrationen

Nach der Beladung wurden die Zellen einmal mit Mes/ Tris-Puffer 100 mM, pH 8, gewaschen, der 5 mM NaCl, 5 mM KCl sowie 1,3 M Sorbitol enthielt, um isoosmotische Bedingungen einzustellen. Danach wurden die Zellen in Na^+ - und K^+ -freien Puffern unterschiedlicher Sorbitol-Konzentrationen (0,25 M bis 1,3 M) resuspendiert und 1 min inkubiert. Anschließend wurde jeweils 1 ml Zellsuspension zentrifugiert und Überstand und Pellet sofort voneinander getrennt. Um die Zellen zu lysieren, wurde das Pellet in 1 % CTAB gelöst und 15 min im Ultraschallbad inkubiert. Der Extrakt wurde 20fach verdünnt und der Gehalt der Ionen mittels Flammenphotometrie bestimmt (Elex 6361, Eppendorf, Hamburg, D). Der Gesamtgehalt der Ionen wurde nach Lyse der Zellen durch CTAB-Behandlung (s. 2.4.2.1) im Überstand gemessen.

2.4.6 ATP-Bestimmung

Die Lichtemission bei Umsatz von ATP durch das Luciferin/ Luciferase-System bildet die Grundlage des Nachweises der Adeninnukleotide ATP und ADP (modifiziert nach Lundin *et al.*, 1976 und Schimz *et al.*, 1981).



Der verwendete Luciferin/ Luciferase-Rohextrakt liefert, anders als hochgereinigte Extrakte, keine zeitlich konstante Lichtemission, so daß statt der Emissionsrate die Lichtemission während der ersten 20 Sekunden der Reaktion bestimmt wurde. Die Proportionalität dieses Meßwertes zum ATP-Gehalt der Probe muß mittels eines ATP-Standards bestimmt werden. ATP-Standardlösungen wurden ebenfalls zur internen Standardisierung der Messung verwendet.

Zum schnellen Probenaufschluß wurden 40 µl der Zellsuspension in 360 µl DMSO pipettiert. Anschließend wurde 1600 µl eiskaltes Wasser zu dieser Suspension gegeben und die Lösung bei -18 °C bis zur Analyse aufbewahrt. Der ATP-Standard wurde 1 µM in einem Puffer mit 50 mM Tris/ H₂SO₄, pH 7,4, 3,5 mM MgSO₄·7H₂O, 2,5 mM K₂SO₂ und 0,6 mM EDTA angesetzt. Der Luciferin/ Luciferase-Extrakt wurde aus einer Suspension von 50 mg Lyophilisat (Sigma, *Buffered Firefly Lantern Extract*) in 10 ml Wasser hergestellt, unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert. Je nach Aktivität wurden 20-200 µl des Extraktes mit 50 µl ATP-Standard und Wasser auf 250 µl aufgefüllt und die Reaktion durch Zugabe von 250 µl Luciferin/ Luciferase-Extrakt gestartet. Die Anzahl der Lichtblitze während der ersten 20 Sekunden nach Start der Reaktion wurden mit einem Bioluminiszenzanalysator (XP 2000, Skan AG, Basel, CH) erfaßt und daraus die entsprechende ATP-Konzentration der Probe über eine Eichkurve unter Berücksichtigung der internen Standards bestimmt.

2.4.7 Hochauflösende ¹H-NMR- Spektroskopie zur Bestimmung von Ectoin

Zur Bestimmung des Ectoingehalts in den Zellen mittels Kernresonanz-Spektroskopie (NMR-Spektroskopie) wurden Überstände und Zellextrakte nach hypoosmotischem Schock gefiltert (Spritzenvorsatzfilter, Faust, Porengröße: 0,22 µm), lyophilisiert, in ²H₂O gelöst und in 5 mm NMR- Röhrchen (Norell, Mays Landing, NJ, USA) umgefüllt. Die hochaufgelösten ¹H-NMR Spektren wurden mit einem AMX-400 WB NMR- Spektrometer (Bruker, Karlsruhe, D) bei 298,2 K gemessen. Das Gerät mit einer Magnetfeldstärke von 9,4 T (entsprechend 400,13 MHz Protonen-Resonanzfrequenz) war mit einem Multi-Channel-Interface ausgerüstet und wurde mit dem Software-Paket UXNMR (Bruker, Karlsruhe, D) betrieben. Zur Erhaltung der Magnetfeld-Konstanz wurde über die Deuterium-Resonanzfrequenz abgeglichen (Deuterium-Lock) und der Magnet schwingungs isoliert (Niveau-Regulierung ELC-04A, Schiller, Roetgen, D). Für die Messungen wurde ein inverser 5 mm GRASP-Probenkopf (Bruker, Karlsruhe, D) verwendet und folgende Meßparameter gewählt: 25 s Relaxationszeit, 2 s Wasser-Unterdrückungspuls (Peters-Wendisch *et al.*, 1996), 9 µs 90 ° Transmitterpuls, 6 kHz Spektral-

weite, 32 k Fourier Datentransformation und 64 akkumulierte Einzelmessungen. Alle Protonen-Resonanzfrequenzen sind in ppm Verschiebung zur Frequenz der spektralen Referenz Natrium-3-Trimethylsilyl-[2,2',3,3'-D₄]-Propionat (TSP) angegeben. Um die Moleküle Ectoin und Glycinbetain im Spektrum zu identifizieren, wurden Referenzspektren von der Reinsubstanz angefertigt (Abb.5).

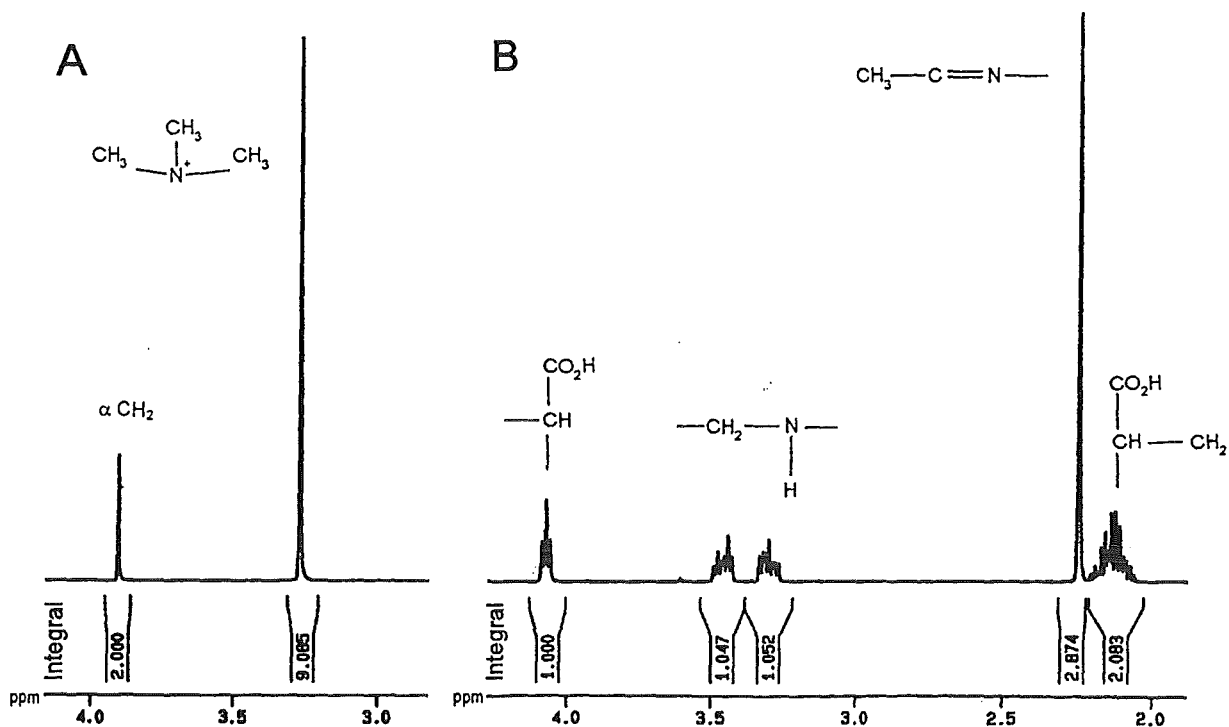


Abb. 5: ¹H-NMR Standardspektren von Glycinbetain (A) und Ectoin (B). 2 µg der jeweils reinen Substanz wurden in ²H₂O gelöst, mit 2 mM internem Standard TSP versetzt und das Spektrum aufgenommen. Dargestellt sind die Protonen-Resonanzfrequenzen der Substituenten in ppm Verschiebung zur Frequenz von TSP.

2.5 Bestimmung des Cytoplasmavolumens

Das cytoplasmatische Volumen wurde mit Hilfe einer nicht-permeablen Substanz und einer permeablen Substanz bestimmt (Ebbighausen *et al.*, 1991). Die permeable Sonde ³H₂O zeigt das Gesamtvolumen, die nicht permeable Sonde [¹⁴C]-Carboxyinulin das externe Volumen an. Das intrazelluläre Volumen ergibt sich aus der Differenz dieser beiden Volumina. Nach hypoosmotischem Schock wurden die Zellen (500 µl, ca. OD 5) 5 min mit

beiden radioaktiv markierten Sonden inkubiert. Anschließend wurde eine Silikonölzentrifugation (5 Proben à 100 µl) durchgeführt (s. 2.4.1). Die Volumenaktivität der Sonden im Reaktionsansatz betrug ca. 100 KBq/ ml für $^3\text{H}_2\text{O}$ und 25 KBq/ ml für $[^{14}\text{C}]$ -Carboxyinulin. Die Radioaktivität der beiden Isotope (in den Überständen und Sedimenten) wurde in einem Flüssig-Szintillationszähler (Rackbeta 1214, LKB, S) bestimmt.

2.6 Bestimmung des Membranpotentials

Das Membranpotential wurde über die Verteilung der membranpermeablen Sonde $[^{14}\text{C}]$ -Tetraphenylphosphoniumbromid (TPP^+) gemessen (Rottenberg, 1979). In einer Konzentration von $< 10 \mu\text{M}$ ergibt sich für TPP^+ eine Nernst'sche Verteilung über der Membran. Das chemische Potential der Sonde entspricht dann dem Membranpotential. Die Berechnung des Membranpotentials ergibt sich damit aus der folgenden Gleichung:

$$\Delta\psi = - 2,303 RT/F \log ([\text{TPP}^+_{\text{intern}}] / [\text{TPP}^+_{\text{extern}}])$$

Mit Hilfe der Silikonölzentrifugation wurden Zellen (OD 4-10) nach 1 minütiger Inkubation mit $8 \mu\text{M}$ TPP^+ (710 MBq/ mmol) bei 30°C von dem umgebenden Medium abgetrennt. Zur Bestimmung der Radioaktivität in den Gesamtansätzen wurden ebenfalls Aliquots genommen. Die Radioaktivität in den Zellen ergibt sich aus der Differenz der Radioaktivität im Gesamtansatz und im Überstand. Da nur die Membranpotential-Differenz von Interesse war, wurde auf eine Korrektur für die nicht- Nernst'sche Bindung der Sonde an die Cytoplasmamembran verzichtet.

2.7 Elektrophysiologische Untersuchungen

2.7.1 Membranpräparation aus *C. glutamicum*

Für eine Präparation von Membranen aus *C. glutamicum* wurden 100 ml Zellen einer Übernachtskultur in BHI-Medium nach ihrer Ernte zweimal mit 0,9 % NaCl gewaschen (m/ v) und anschließend in 15 ml eines Phosphatpuffers (50 mM NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 , 1 mM MgSO_4 , pH 7) aufgenommen. Der Zellaufschluß erfolgte durch „French®- press“-Behandlung. Drei „French®- press“- Zyklen bei einem Druck von 20.000 psi (20 K French® pressure cell) führten zu einer Zerstörung der Zellen. Im Anschluß wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 10 000 g abgetrennt (Zentrifuge: Avanti™, Rotor: JA 25.50; Beckman). Anschließend wurden die Membranen mit einer 30 minütigen

Ultrazentrifugation bei 100 000 g konzentriert (Zentrifuge: Optima™TLX UZ, Rotor: TLA 100.4, Beckman), zweimal mit *Aqua bidest.* gewaschen und dann in 200 ml des oben genannten Puffer resuspendiert.

Die Auftrennung der so erhaltenen Membranfragmente erfolgte auf einem Saccharose-Gradienten (3 ml 30 %, 4 ml 40 % und 3 ml 70 %) nach Niederweiss *et al.* (1995). Der Gradient wurde 16 h bei 170 000 g (Rotor SW41, Beckmann) zentrifugiert. Durch diese Behandlung wurden 4 Fraktionen erhalten (s. Abb. 29). Diese wurden gesammelt, mit Phosphatpuffer gewaschen, durch Zentrifugation bei 75 000 g konzentriert und in jeweils 100 µl Membranpuffer aufgenommen, der den Proteinase-Inhibitor Complete (1:1000, Boehringer, Mannheim, D) sowie 2,5 mM EDTA enthielt.

2.7.2 Bestimmung des Proteingehalts

Der Proteingehalt der Fraktionen wurde mit einem für Membranproteine modifizierten Test nach Lowry (1951) durchgeführt. Lösung A bestand aus 96 ml 3% Na₂CO₃ in 0,1 N NaOH; 2 ml 4 % NaKTartrat in 11,6 % SDS, 2 ml 1% CuSO₄·5H₂O; Lösung B aus Folin-Reagent:H₂O (1:1). 2 µl, 5 µl bzw. 10 µl der jeweiligen Fraktionen wurden mit H₂O *bidest.* auf ein Volumen von 200 µl verdünnt und mit 2 ml der Lösung A für 10 min inkubiert. Anschließend wurden 0,2 ml der Lösung B zugegeben und nochmals 30 min inkubiert. Die Extinktion wurde bei 660 nm gemessen. Die entsprechende Proteinkonzentration wurde einer mit BSA erstellten Eichkurve entnommen. Die Fraktionen wurden mit einer Konzentration von 1 µg/ µl à 50 µl aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

2.7.3 Bestimmung der NADH-Oxidase-Aktivität

Die Aktivität der NADH-Oxidase wurde mit einem Enzym-Assay nach Osborn *et al.* (1972) durchgeführt. Gemessen wird die Extinktionsabnahme bei E₃₄₀ nach Zugabe der Membranfragmente (30 µl, 1 µg Protein/µl) in 970 µl eines 50 mM Tris-HCl-Puffers (pH 7,5), der 0,12 mM NADH sowie 0,2 mM Dithiothreitol (DTT) enthielt. Die Reaktion folgt einer Kinetik erster Ordnung. Die spezifische Aktivität wurde aus der jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten mit einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{\text{NADH}} = 6,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ berechnet.

2.7.4 Herstellung von *giant liposoms*

Die Membranfragmente der Fraktion 2, welche die höchste NADH-Oxidase-Aktivität aufwiesen (s. Kap. 3.4.1), wurden mit Asolectinliposomen (aus Sojabohnen, Typ IV-S, Sigma, Deisenhofen, D) nach einer Dehydratations-Rehydratationsmethode fusioniert wie von

Berrier *et al.* (1989) beschrieben (vergl. Abb. 6). Zur Herstellung der Proteoliposomen wurden 10 bis 20 mg Azolectin in 500 μ l Chloroform gelöst und mit N_2 begast, bis das

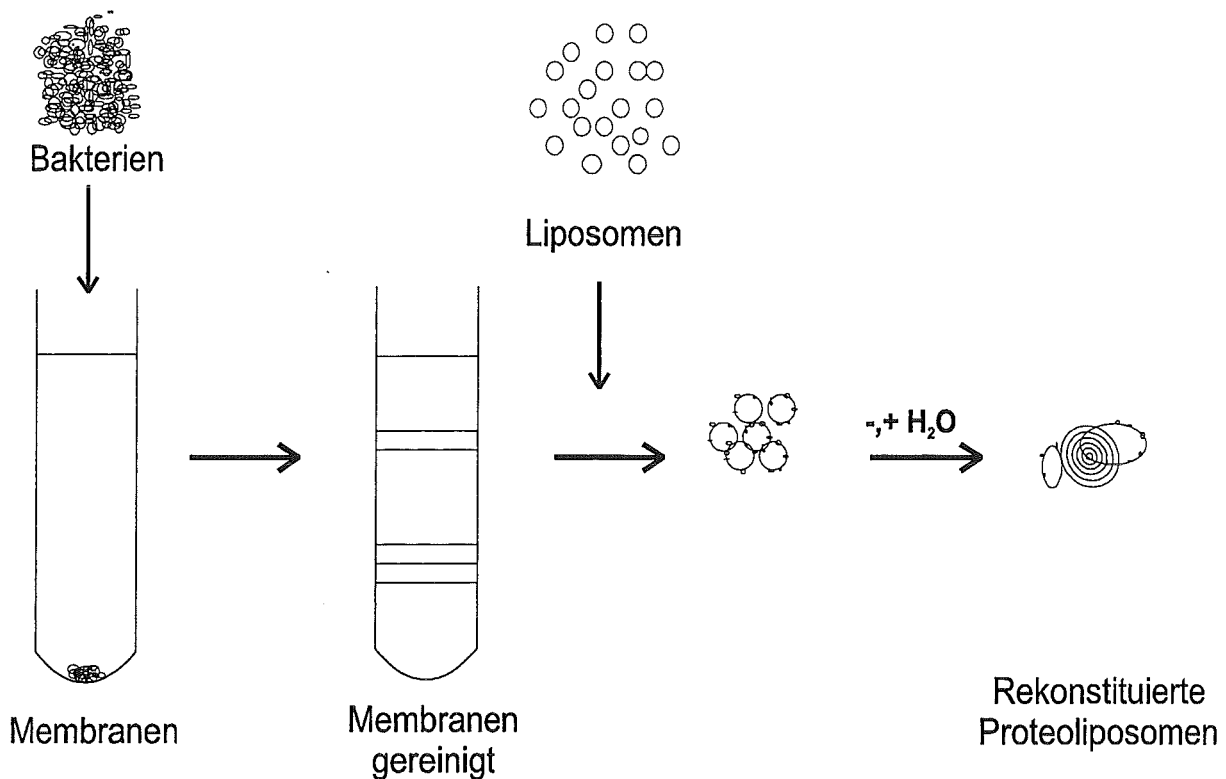


Abb. 6: Präparation für die Untersuchung mechanosensitiver Kanäle aus *C. glutamicum*. Die gereinigte Membranfraktion mit der höchsten NADH-Oxidase-Aktivität wird mit Asolectinliposomen aus Sojabohnen fusioniert, indem sie zusammen zentrifugiert und einem Dehydratations-/ Rehydrationszyklus unterworfen werden. Diese Prozedur wandelt die kleinen fusionierten Proteoliposomen in große, sogenannte *giant liposomes* um.

Chloroform vollständig verdampft war. Der zurückbleibende Lipidfilm wurde mit einer Pufferlösung (10 mM HEPES, pH 7,4 und 100 mM KCl) auf eine Konzentration von 20 mg/ ml gebracht und zur Bildung von kleinen Liposomen 5 min im Ultraschallbad beschallt. 100 μ l dieser Lösung wurden mit 100 μ l der Fraktion 2 in 0,8 ml des oben genannten Puffers gelöst, so daß sich ein Lipid-Protein-Verhältnis von 20:1 ergab. Anschließend erfolgte eine 30 minütige Zentrifugation bei 170.000 g (Rotor: TLA 100.4, Beckman). Das Pellet wurde in 20 μ l des gleichen Puffers mit geringerem Salzgehalt (10 mM KCl statt 100 mM KCl) aufgenommen, á 7 μ l in eine Mikrotiterplatte aliquotiert und in einem Vakuum- Exsikkator dehydratisiert. Nach vollständiger Trocknung wurde das Lipid-Protein-Gemisch mit 20 μ l 100 mM KCl-Puffer überschichtet und über Nacht rehydratisiert. Die so gewonnen Proteoliposomen, auch *giant liposomes* genannt, waren 3 Tage lang bei 4 °C bis 8 °C haltbar.

2.7.5 Elektrophysiologische Messungen

Bei der elektrophysiologischen Messung von Kanälen wird der Stromfluß über eine Membran gemessen, die fest an eine Pipette angesaugt wird. Die Pipette ist mit einer bestimmten Pufferlösung gefüllt und über eine Elektrode mit einer Meßstation verbunden, mit der zum einen elektronische Signale verstärkt und aufgenommen, zum anderen aber auch künstliche Spannungen an das System angelegt werden können. Die untersuchten Zellen befinden sich ebenfalls in einer Pufferlösung (= Badlösung), in die eine Referenzelektrode eingetaucht ist. Ist ein Teil der Zellmembran (= *patch*) dicht an die Pipette angesaugt, spricht man von einem *seal*. Bei geschlossenen Kanälen sollte auch mit angelegter Klemmspannung kein Stromfluß zu messen sein, da die Membran hauptsächlich aus einer elektrisch nichtleitenden Lipiddoppelschicht besteht. Erst nach Aktivierung der Kanäle fließt ein mit der Zeit konstanter, meßbarer Strom durch die geöffneten Kanäle.

Die einzelnen Kanal-Aktivitäten wurden nach der Methode von Hamill *et al.* (1981) aufgenommen. 2 µl der Proteoliposom-Lösung wurden in eine Petrischale pipettiert und nach 1 min mit 1,5 - 2 ml Bad-Puffer (100 mM HEPES/ NaOH, pH 7,4, 100 mM KCl) vorsichtig überschichtet. Die *patch*- Elektroden wurden mit einem Kapillar- *puller* (Pyrex Capillaries, Corning Code 7740) gezogen, nicht feuerpoliert und mit folgendem Pipettenpuffer gefüllt: 10 mM HEPES/ NaOH, pH 7,4, 100 mM KCl, 2mM CaCl₂ und 5 mM MgCl₂. Die Aufnahmen wurden im *cell-attached*- sowie im *excised*- Modus durchgeführt (Abb. 7). Im ersten Fall verblieb die Elektrode während der gesamten Messung an dem gepatchten Vesikel. Im *excised*- Modus wurde der aus der Pipette ragende Teil des Vesikels durch eine wenige Sekunden dauernde

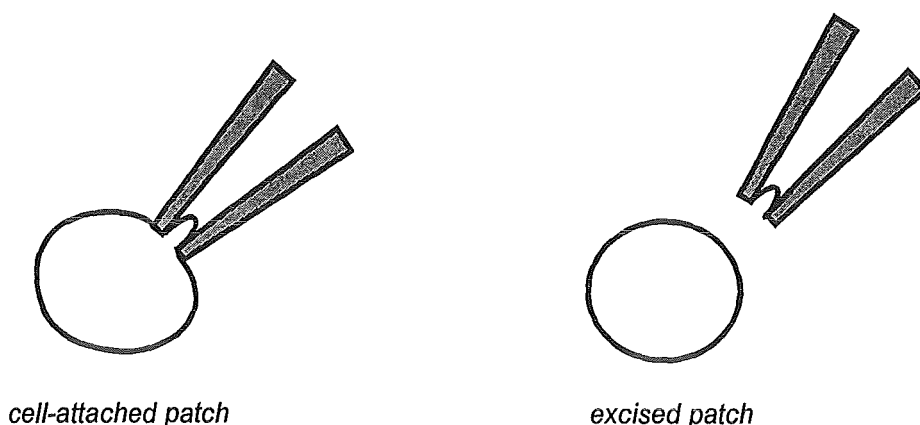


Abb. 7: Die für die elektrophysiologischen Messungen gewählten Konfigurationen.

Exposition an der Luft zerstört. Es resultierte ein sogenannter *inside-out patch*, bei dem die cytoplasmatische Seite der Membran ins Außenmedium ragte. Da die Proteoliposomen aber mit dem gleichen Puffer, der auch für die Messungen eingesetzt wurde, hergestellt wurden, konnte zwischen beiden Modi kein Unterschied der Aufnahmen festgestellt werden. *Patches* im *excised*-Modus waren lediglich länger haltbar und strapazierfähiger. Membranspannung wurde über eine Spritze angebracht und mit einem piezoelektrischen Druckfühler aufgenommen. Die einzelnen Ströme wurden mit einem Dagan 8900 oder einem Biologic RK-300 Patch-Clamp Amplifier mit 10 G Ω Feedback Widerstand aufgenommen und auf einem digitalen Audiotape gespeichert (Biologic DTR 1200 DAT Recorder). Die Aufnahmen wurden mit einem 4-pole Bessel Low-Pass Filter bei 300 Hz gefiltert, *offline* digitalisiert und auf einem Tandom 386 Computer mit einem Programm, das von G. Sadoc aus Orsay (Université Paris-Sud) entwickelt wurde, analysiert. Das Membranpotential ist als Potential des Bad-Puffers angegeben, das Pipetten-Potential wurde gleich Null gesetzt.

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Techniken zur DNA-Rekombination

Standard-DNA-Techniken wie Restriktionen, DNA-Fällungen, Phenol-Extraktionen, Ligationen, Klenow-Reaktionen und Behandlungen mit alkalischer Phosphatase wurden nach Sambrook *et al.* (1989) bzw. nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.8.2 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Zur Überprüfung rekombinanter Klone von *E. coli* wurde die Plasmid-DNA nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) aus 5 ml LB-Übernachtskulturen isoliert. Dabei wurde das Minipräparations-Kit der Fa. Qiagen (Hilden, D) angewandt. Nach Lyse der Zellen und Abtrennung der denaturierten, nicht-löslichen Zellbestandteile wurde die DNA der verbliebenen Lösung mit Hilfe von Säulen aus Silicagel gereinigt. Das positiv geladene Säulenmaterial bindet die negativ geladene Plasmid-DNA, während andere Zellbestandteile in Waschschritten entfernt werden. Die DNA wurde mit 50 μ l sterilem H₂O *bideest.* von der Säule eluiert. Die Präparationen wurden nach dem Protokoll der Fa. Qiagen durchgeführt.

2.8.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA- Fragmenten zur Ligation wurden diese nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit Hilfe des PCR- Extraktions- Kit der Firma Qiagen (Hilden, D) aus Agarose-Gelen isoliert. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. In diesem Verfahren wird die Agarose zunächst mit einer 7 M Natriumhypochlorid-Lösung solubilisiert und die DNA in einem zweiten Schritt an Silicakugeln gebunden. Nach mehreren Waschschritten wird die DNA mit 50 µl sterilem H₂O *bidest.* wieder von der Matrix abgelöst.

2.8.4 Transformation von *E. coli*

Für den Transfer von Plasmid-DNA wurden kompetente Zellen des Stammes DH5α*mcr* (vergl. 2.3.2) auf Eis aufgetaut. Jeweils 200 µl Zellen wurden zu 20 µl Plasmid-DNA gegeben und zunächst 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42 °C. Nach Zugabe von 800 µl SOC-Medium (SOB-Medium -5 g Trypton, 1,25 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 625 µl 1 M KCl ad 250 ml, nach dem Autoklavieren werden 1,25 ml sterile 2M MgCl₂-Lösung zugegeben- plus 0,4 % Glucose) konnten die Zellen 1 h bei 37 °C regenerieren, bevor sie auf LB-Agarplatten, die 25-50 mg/ ml Carbenicillin enthielten, ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert wurden.

2.8.5 Polymerase-Kettenreaktion

2.8.5.1 Herstellung der Oligonukleotide

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), ein Verfahren zur Amplifikation von DNA, wurde in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen bzw. zur Suche des Gens für den großen mechanosensitiven Kanal in *C. glutamicum* eingesetzt. Die für die PCR benötigten Oligonukleotide oder *primer* wurden anhand der stark konservierten Regionen bereits bekannter Gene aus den folgenden Organismen konstruiert: *B. subtilis*, *Clostridium perfringens*, *E. coli*, *Erwinia carotovora*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* und *Synechocystis* PCC 6803 (Moe *et al.*, 1998). Das Sequenz-*alignment* (s. Abb. 28) wurde mit dem Programm „Mult Alin“ von Florence Corpet durchgeführt (<http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html>). Es wurden 5 *Primer* für die stark konservierten Regionen im C-terminalen Bereich konstruiert: 1. KEFREF, 2. FAMRGN, 3. VDLAV, 4. VGVIIIG, 5. AFGKIVS, sowie 5 *Primer* für den nicht so gut konservierten N-terminalen Bereich: 1. FLIVAF, 2. AFAVY, 3. IKLINKL, 4. KKGEV,

5. **TEIRDL.** Sie waren entweder vollständig degeneriert oder aber eingeschränkt degeneriert unter Berücksichtigung der *codon usage* von *C. glutamicum* sowie der Gensequenz des stark verwandten Organismus *M. tuberculosis*. Die so konstruierten Oligonukleotide wurden entweder von der Firma MWG-Biotech GmbH (Ebersberg, D) geliefert oder mit dem DNA-Synthesizer Gene-Assembler Plus (Pharmacia-LKB, Freiburg, D) nach der Phosphoramidit-Methode (Caruthers *et al.*, 1987) hergestellt. Die Synthese erfolgte im Maßstab von 0,2 µmol unter Abspaltung der letzten Tritylgruppe. Abtrennung vom Säulenmaterial und Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte durch Inkubation der Oligonukleotide über Nacht in 30 % Ammoniak bei 50 °C. Die Reinigung und Umpufferung der *primer* erfolgte über eine Gelfiltration mit Sephadex-G (NAP10 Säulen, Pharmacia) nach Herstellerangabe. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Eine Lösung mit 5 nmol eines aus 20 Basen bestehenden Oligonukleotids weist eine Extinktion von 1 auf.

2.8.5.2 Durchführung der PCR

In der Reaktionsfolge der PCR hybridisieren zu Beginn ausgehend von DNA-Einzelsträngen, die bei einer Initialtemperatur von 94 °C erzeugt wurden, *primer* an die komplementären Sequenzen der chromosomalen DNA. Dies geschieht bei einer spezifisch für jedes *primer*-Paar berechneten *annealing*-Temperatur (Faustregel: 2 °C pro A,T; 4 °C pro C,G). Bei der anschließenden Temperaturerhöhung auf 72 °C beginnt die *Taq*-Polymerase mit der Synthese komplementärer Tochterstränge. Nach einer Reaktionszeit, die entsprechend der Größe des durch die PCR zu vermehrenden DNA-Fragments gewählt wurde, wird die Reaktion durch Aufheizen auf 94 °C abgebrochen; Matrize und Tochterstrang werden getrennt. Im nächsten Reaktionszyklus dient neben dem ursprünglichen DNA-Strang der Tochterstrang ebenfalls als Matrize. Nach einem erneuten Erhitzen auf 94 °C liegt dann ein DNA-Einzelstrang vor, der genau dem von den Oligonukleotiden eingefassten DNA-Abschnitt entspricht. Dieser Zyklus kann bis zu 35 mal wiederholt werden. Aus einer genomischen Vorlage entstehen millionenfache Kopien des durch die *primer* eingefassten DNA-Bereichs.

Zur Gewinnung der *template*-DNA von *C. glutamicum* wurde chromosomale DNA aus dem Wildtyp-Stamm ATCC 13032 präpariert. Genomische DNA von *M. tuberculosis* wurde freundlicherweise von Dr. B. Bishai, Department of Molecular Microbiology and Immunology, Johns Hopkins University, Baltimore, USA zur Verfügung gestellt. Genomische DNA von *B. subtilis* wurde von Dr. M. Klein, Institut für Biotechnologie, Forschungszentrum Jülich, D, genomische DNA von *E. coli* von M. Jakoby, Institut für Biochemie, Universität zu Köln, D, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

In einem 50 µl Reaktionsansatz wurden zu ca. 0,1 pM dieser DNA 100-250 pmol der jeweiligen Oligonukleotide, eine hitzestabile DNA-Polymerase (*Taq*, 1 Unit, Boehringer, Mannheim, D) aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*, PCR-Puffer (100 mM Tris/ HCl, pH 8,3, 15 mM MgCl₂, 0,5 M KCl, Boehringer, Mannheim, D) und dNTP-Mix (10 mM je dNTP, Boehringer, Mannheim, D) gegeben. Die Reaktionsfolge der PCR erfolgte in einem Thermocycler (*Mastercycler Gradient* der Firma Eppendorf, Hamburg, D) unter Einstellung eines Temperaturgradienten von 20 °C. So konnten gleichzeitig 12 verschiedene *annealing*- Temperaturen „abgetastet“ werden. Um eine Bildung unspezifischer PCR-Produkte zu vermeiden, wurde eine *hot start*-PCR durchgeführt. Dabei wurden die Reaktionsansätze erst in den Thermocycler eingesetzt, wenn dieser auf die initiale Denaturierungstemperatur von 94 °C aufgeheizt war. Die in der PCR erhaltenen DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese isoliert und anhand ihrer Größe charakterisiert. Zur Suche nach dem Gen für den großen mechanosensitiven Kanal wurden die Fragmente aus dem Gel gereinigt (s. 2.8.3) und einer Sequenzanalyse unterworfen.

2.8.6 Sequenzierung von DNA und Sequenzanalyse

Um die erhaltenen PCR-Produkte zu überprüfen, wurden sie mit Ausnahme der PCR-Produkte von *M. tuberculosis*, in die *Sma* I-Schnittstelle des Vektors pUC19 ligiert und in DH5α*mcr*-Zellen transformiert. Diese Zellen wurden in LB-Medium angezogen und ihre Plasmid DNA wieder präpariert und sequenziert. Die Sequenzierreaktion selbst wurde nach der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) mit Modifikationen nach Zimmermann *et al.* (1990) durchgeführt. Bei der hier beschriebenen Methode wird der Kettenabbruch von Nukleotiden ausgelöst, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die Reaktion entspricht einer abgewandelten PCR, in die eine modifizierte AmpliTaq®DNA Polymerase eingesetzt wird, die unempfindlich gegenüber den markierten Nukleotiden ist. Die Sequenzierreaktion wurde gemäß des Herstellerprotokolls ausgeführt (ABI PRISM™ *Big Dye Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit*, Applied Biosystems, Weiterstadt, D), und die Sequenzierungsprodukte mit der automatischen Sequenzierapparatur ABI PRISM 310 (PE Applied Biosystems) kapillarelektrophoretisch getrennt und detektiert. Um die PCR-Produkte von *M. tuberculosis* zu analysieren, wurden sie aufgereinigt (s. 2.8.3) und direkt in die Sequenzierungsreaktion eingesetzt. Als *primer* wurden die für *M. tuberculosis* konstruierten Oligonukleotide (s. 2.8.5.1) jeweils einzeln in die Reaktion eingesetzt. Ansonsten wurde wie oben beschrieben verfahren.

2.8.7 Southern-Blot-Hybridisierung

Zur Identifizierung des *mscL* in *C. glutamicum* wurden ebenfalls DNA:DNA-Hybridisierungen nach Southern (1975) durchgeführt.

Genomische DNA von *C. glutamicum* wurde über Nacht mit den Restriktionsenzymen *Bam*H I, *Hind* III, *Sal* I und *Xba* I verdaut. Als Kontrolle wurde ebenfalls DNA von *E. coli*, *M. tuberculosis* und *B. subtilis* mit *Bam*H I verdaut. Die DNA wurde in einem Agarosegel (0,8 %; 20 V, 20 h) elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Vakuumtransfer (LKB 2016 VacuGene, Pharmacia) wurde die DNA auf eine Nylonmembran (Schleicher & Schüll) übertragen. Dazu wurde das auf die Nylonmembran aufgelegte Agarosegel für jeweils 20 min mit Depurinierungslösung (0,3 N HCl), mit Denaturierungslösung (0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl) und anschließend mit Neutralisierungslösung (1 M Tris-HCl, pH 7,5, 1,5 M NaCl) überschichtet. Der vollständige DNA-Transfer auf die Membran erfolgte durch 1stündige Behandlung mit 20 x SSC-Lösung (0,3 M Na-Citrat/HCl pH 7, 0,3 M NaCl). Nach dem Trocknen der Nylonmembran wurde die DNA auf dieser durch UV-Bestrahlung (3 min, 366nm) fixiert. Vor der DNA:DNA-Hybridisierung wurde die Membran 1 h bei 68 °C in Prähybridisierungslösung (1 % Blockingreagenz, Boehringer, Ingelheim, D; 2 x SSC, 0,1 % Laurylsarcosine, 0,02 % SDS) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Die Lösung wurde dann durch 7 ml Hybridisierungslösung ersetzt, der die bei 100 °C denaturierten Sonden zugegeben waren. Als Sonden wurden die DIG-dUTP-markierten PCR-Fragmente der *mscL*-Gene aus *E. coli*, *B. subtilis* und *M. tuberculosis* verwendet. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht jeweils bei 65 °C, 55 °C, 45 °C und 40 °C. Unspezifisch gebundene DNA wurde durch Waschen mit Lösung 1 (2 x SSC, 0,1 % SDS) bei Raumtemperatur und nachfolgendem Waschen mit Lösung 2 (0,1 x SSC, 0,1 % SDS) bei 68 °C entfernt. Der immunologische Nachweis der DNA:DNA-Hybride erfolgte mit Hilfe des *DNA-labeling and -detection kit* (Boehringer, Mannheim, D) gemäß des Herstellerprotokolls. Dabei wurde ein spezifisches Antikörperkonjugat an die DIG-Markierung der DNA gebunden. Das entstandene Hybrid konnte anschließend durch eine nachfolgende enzymkatalysierte Farbreaktion in Gegenwart von 5-Bromo-4-chlor-2-indolylphosphat (X-Phosphat) und Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT) nachgewiesen werden.

3. Ergebnisse

3.1 Biochemische Untersuchungen des hypoosmotisch induzierten Effluxsystems in *C. glutamicum*

In hypoosmotischer Umgebung ist die externe Konzentration osmotisch gelöster Teilchen niedriger als in den Zellen. Daraufhin setzt zum Ausgleich des osmotischen Potentials ein nach innen gerichteter Wasserfluß, auch Osmose genannt, ein, der die Zellen anschwellen läßt und so mechanischen Streß auf die Zellmembran ausübt. Wie viele andere Bakterien reagiert *C. glutamicum* darauf mit dem Ausschleusen osmotisch wirksamer Substanzen, um durch die Senkung der internen Osmolalität wieder einen physiologischen Turgordruck herzustellen. Um Funktion und Regulation des System, das diesen osmotisch stimulierten Efflux vermittelt, zu charakterisieren, wurden seine Kinetik, Regulation, Spezifität und Inhibierbarkeit untersucht.

3.1.1 Abhängigkeit des cytoplasmatischen Volumens von der externen Osmolalität

Mit dem oben erwähnten Wasserfluß über der Membran gehen Volumenveränderungen einher, d.h. mit sinkender externer Osmolalität nimmt das cytoplasmatische Volumen der Zellen zu. Zur genauen Berechnung der internen Konzentrationen der kompatiblen Solute ist es deshalb notwendig, das cytoplasmatische Volumen bei der jeweiligen externen Osmolalität zu bestimmen. Die Zellen wurden dazu in hyperosmolarem Puffer in Anwesenheit von Glycinbetain inkubiert und anschließend dem jeweiligen hypoosmotischen Schock unterworfen. Gleichzeitig wurde das cytoplasmatische Volumen gemessen. Die Abhängigkeit des spezifischen Zellvolumens von der externen Osmolalität ist in Abb. 8 dargestellt. Wie erwartet, korreliert das spezifische Zellvolumen mit der äußeren Osmolalität. Die hier ermittelten Werte wurden zur Bestimmung der internen Prolin- bzw. Glycinbetainkonzentrationen eingesetzt.

3.1.2 Kinetik des Efflux kompatibler Solute

Um den Efflux kompatibler Solute nach hypoosmotischem Schock zu untersuchen, wurden die Bakterienzellen in hyperosmotischem Puffer, der eine Osmolalität zwischen 1860 mOsm und 2100 mOsm aufwies, mit den radioaktiv markierten kompatiblen Soluten Prolin oder

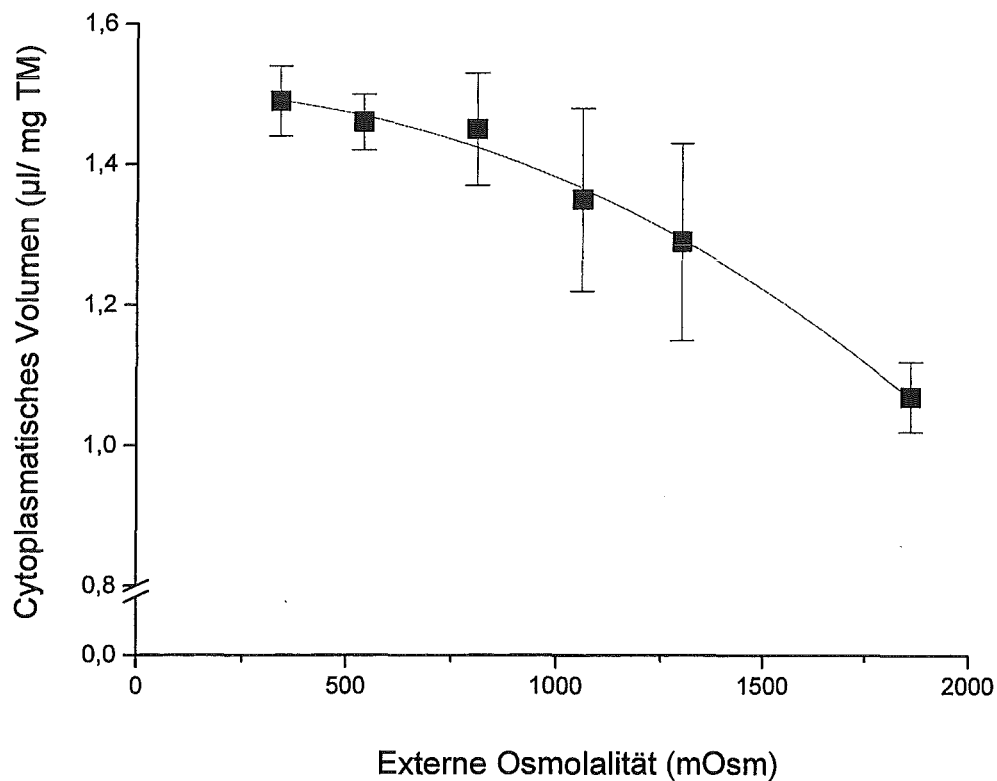


Abb. 8: Spezifisches Zellvolumen in Abhängigkeit der externen Osmolalität. Die Zellen wurden wie unter 2.5 beschrieben behandelt. Die radioaktiv markierten Sonden wurden zeitgleich mit dem osmotischen Schock appliziert. Das cytoplasmatische Volumen wurde mittels Silikonölzentrifugation 5 min nach Einstellung der jeweiligen externen Osmolalität bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt hat die Verteilung der Sonden ihre Gleichgewichtseinstellung erreicht.

Glycinbetain beladen. Ausgehend von dieser hohen Osmolalität wurden die Zellen in Puffer abgestuft niedrigerer Osmolalität und zur Kontrolle in isoosmolarem Puffer resuspendiert und der Gehalt der kompatiblen Solute in den Zellen und im umgebenen Medium bestimmt. Als repräsentatives Beispiel ist in Abb. 9 der hypoosmotisch induzierte Efflux von Prolin dargestellt. Sobald die externe Osmolalität gesenkt wurde, exportierten die Zellen das vorher akkumulierte Prolin. Die Stärke des Efflux war dabei abhängig von dem Ausmaß des osmotischen Schocks. Unter isoosmotischen Bedingungen fand nur ein sehr geringer Prolin-Efflux statt. Nachdem der neue Gleichgewichtszustand erreicht war, ließ sich weder die weitere Abnahme noch eine erneute Zunahme der cytoplasmatischen Prolin-Konzentration feststel-

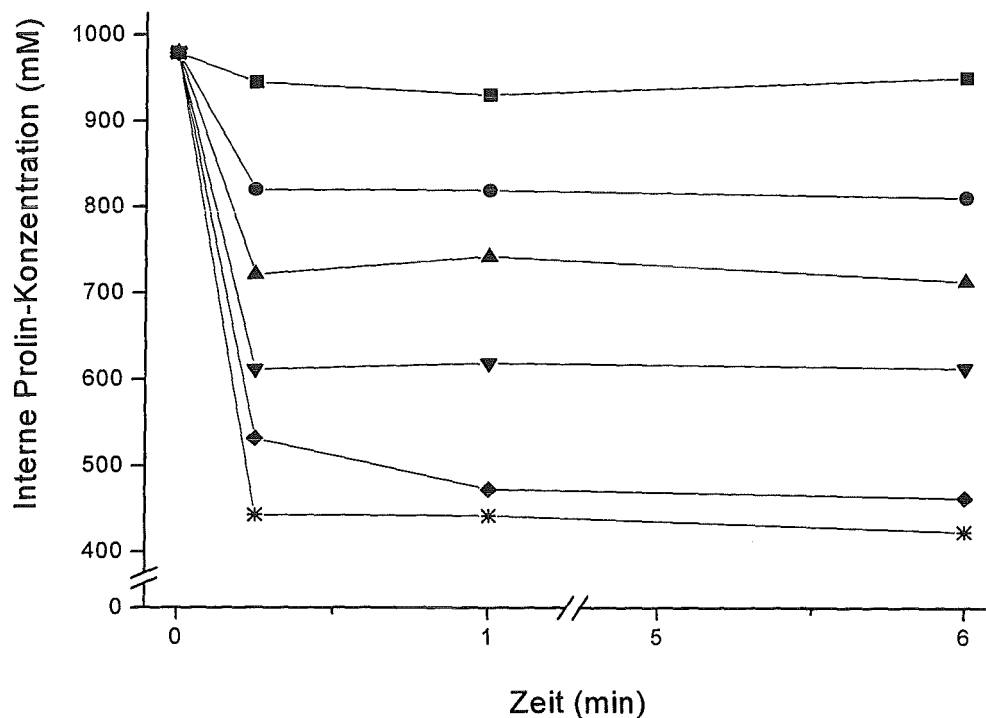


Abb. 9: Zeitverlauf der internen Prolin-Konzentration nach hypoosmotischem Schock.

Zellen von *C. glutamicum* wurden wie unter 2.4.2 beschrieben angezogen. Nach Aufnahme von radioaktiv markiertem Prolin unter hyperosmotischen Bedingungen (1860 mOsm) bei einer OD_{600} von 4 wurden die Zellen sedimentiert und in Puffer abgestufter Osmolalität re-suspendiert (■, 1860 mOsm; ●, 1200 mOsm; ▲, 1060 mOsm; ▼, 810 mOsm; ◆, 540 mOsm; *, 400 mOsm). Nach Entnahme der Proben zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellen und Medium mit Silikonölzentrifugation voneinander getrennt, und der Prolingehalt der Zellen mit einem Szintillationszähler bestimmt. Die internen Konzentrationen wurden für das aktuelle cytoplasmatische Volumen gemäß Abb. 8 korrigiert.

len. Der Efflux von Prolin erfolgte sehr schnell, schon nach 15 s war die gesamte osmoprotektive Substanz ausgetreten. Auch eine schnellere Messung, d.h. Probenentnahme und Zentrifugation innerhalb von 10 s nach Applikation des osmotischen Schocks kam zu einem ähnlichen Ergebnis wie in Abb. 9 gezeigt. Dies deutet darauf hin, daß der Efflux bereits nach dieser kurzen Zeit abgeschlossen ist. Eine genauere zeitliche Auflösung des hypoosmotisch induzierten Effluxes ließ die angewandte Methode der Silikonölzentrifugation nicht zu. Auch durch Senken der Versuchstemperatur von 30 °C auf Raumtemperatur bzw. auf 8 °C konnte

der Efflux nicht verlangsamt und somit auch nicht weiter zeitlich aufgelöst werden. Allerdings ergibt sich bereits unter den beobachteten Bedingungen eine sehr große Efflux-Rate: Wenn sich in dem beobachteten Zeitraum von 10 s die interne Prolin-Konzentration nach starkem hypoosmotischem Schock von ungefähr 2000 mOsM auf 400 mOsM um ca. 800 mM verringert, korrespondiert dies mit einer Transportrate von mindestens $6000 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g TM}^{-1}$. Messungen mit Glycinbetain anstelle von Prolin führten zu vergleichbaren Zeitverläufen und Transportraten des Exportes. Da Glycinbetain nicht als C- oder N- Quelle genutzt werden kann, wird durch dieses Experiment sichergestellt, daß nichts von der ursprünglich aufgenommenen Menge des Osmotikums verloren geht, indem es z.B. von den Zellen für biosynthetische Zwecke eingesetzt wird, und so die Messungen verfälscht werden. Dies konnte ebenfalls durch Messungen mit anderen Methoden, wie HPLC oder NMR bestätigt werden, bei denen die eingesetzten Substanzen chemisch und nicht aufgrund der radioaktiven Markierung identifiziert wurden (vergl. Kapitel 3.1.5).

3.1.3 Regulation des Efflux

Ein Efflux-System mit der Leistungsfähigkeit wie das in dieser Arbeit untersuchte muß streng kontrolliert werden, wenn es keine schädigende Wirkung auf die Zellfunktion haben soll. Es gibt für Zellen grundsätzlich zwei Möglichkeiten, diese Kontrolle durchzuführen: Zum einen durch Kontrolle der Genexpression, d.h. wieviel Transkript- und Protein zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Zelle vorliegen. Diese Regulation kann an allen Schritten auf dem Weg von der genetischen Information bis zum reifen Protein einsetzen, verallgemeinernd soll von der "Regulation auf Expressionsebene" die Rede sein. Die zweite Möglichkeit besteht darin, das Protein direkt in seiner Aktivität zu kontrollieren. Beide Regulationsvarianten sind für das Effluxsystem kompatibler Solute in *C. glutamicum* untersucht worden, die Ergebnisse sind in den beiden folgenden Kapiteln dargestellt.

3.1.3.1 Regulation des Efflux auf Aktivitätsebene

Wie bereits aus der Abb. 9 hervorgeht, ändert sich das Ausmaß des Efflux mit der Stärke des applizierten hypoosmotischen Schocks, der Efflux erfolgt streng abgestuft. Trägt man nun die jeweilige interne Prolin-Konzentration nach hypoosmotischem Schock gegen die extern angelegte Osmolalität auf, so zeigt sich, daß zwischen beiden ein linearer Zusammenhang besteht (Abb.10). Wird anstelle von Prolin Glycinbetain als kompatibles Osmolyt eingesetzt, so ergibt sich die gleiche lineare Abhängigkeit zwischen interner Konzentration und externer Osmolalität (Abb. 12). Die Art des kompatiblen Soluts hat also keinen Einfluß auf den osmotisch stimulierten Efflux.

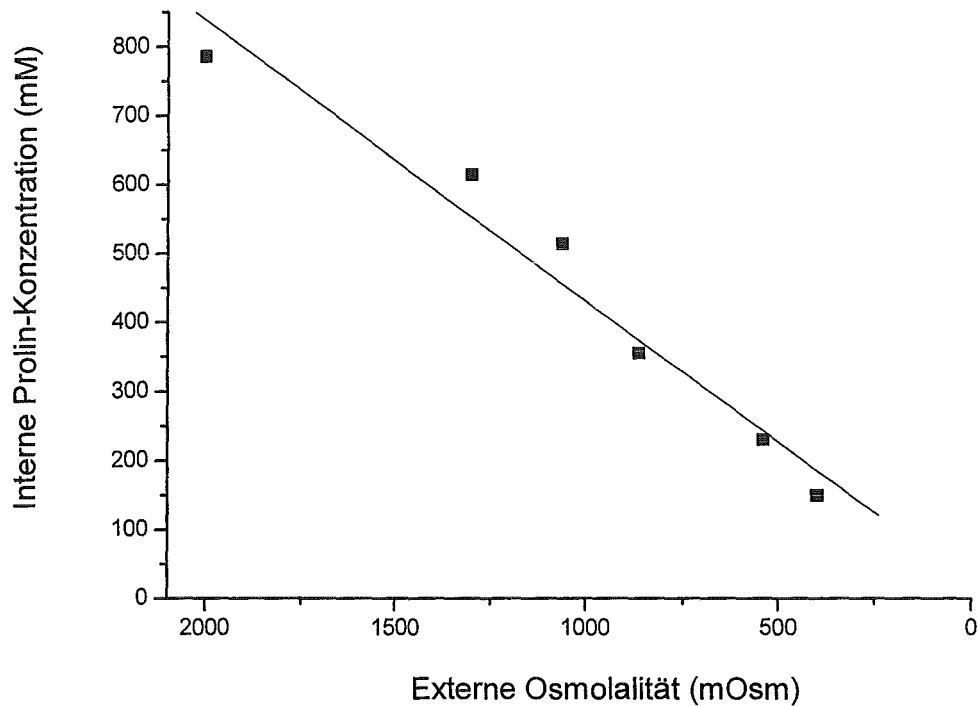


Abb. 10: Zusammenhang zwischen interner Prolin-Konzentration und externer Osmolalität. Die 1 Minute nach erfolgtem osmotischen Schock gemessenen internen Prolin-Konzentrationen aus Abb. 1 sind gegen die externen Osmolalitäten aufgetragen.

Nun stellt sich die Frage, ob der Efflux auch unabhängig von der extern wirksamen osmotischen Substanz ist, und folglich auch mit anderen Osmolyten als NaCl induziert werden kann. Um auszuschließen, daß statt eines osmotischen Effekts ein NaCl-Effekt vorliegt, und der beobachtete Efflux lediglich auf die Änderung der Ionenstärke zurückzuführen ist, wurde der Glycinbetain-Efflux mit Sorbitol als extern osmotisch wirksamer Substanz gemessen. Die Zellen wurden zur Beladung mit [^{14}C]-Glycinbetain eine Stunde in hyperosmotischem Sorbitol- Puffer von 2100 mOsm inkubiert. Eine Minute nach Resuspension der Zellen in niederosmolalen Sorbitol- Puffern wurde das ausgetretene Glycinbetain bestimmt (Abb. 11). Es zeigt sich, daß auch hier die Stärke des Efflux vom Ausmaß des jeweils angelegten osmotischen Gradienten abhängig ist.

Diese Ergebnisse, die in Abb. 12 zusammengefaßt sind, zeigen, daß der Efflux kompatibler Solute in *C. glutamicum* weder von der Art des kompatiblen Soluts, Prolin oder Glycinbetain, noch von dem externen Osmolyt, NaCl oder Sorbitol, abhängig ist. Er wird allein durch die Differenz des osmotischen Potentials über der Membran reguliert.

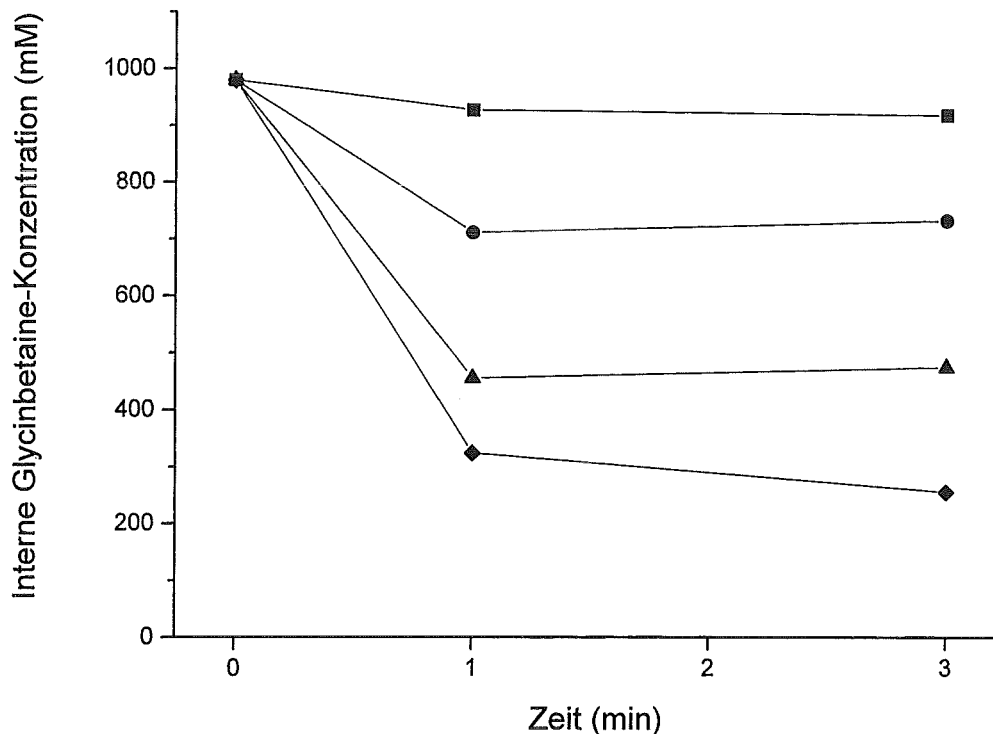


Abb. 11: Hypoosmotisch induzierter Efflux von Glycinbetain mit Sorbitol als externem Osmolytikum. Ausgehend von dem hyperosmolaren Inkubationspuffer (2100 mOsM) wurden die Zellen in Sorbitol-Puffer mit unterschiedlichen Osmolalitäten (■ 2100 mOsM, ● 1100 mOsM, ▲ 710 mOsM, ▼ 370 mOsM) resuspendiert. Die interne Glycinbetaine-Konzentration wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach Trennung der Zellen vom Medium durch Sili-konölkentrifugation mittels Szintillations-Zählung bestimmt.

Mit zwei weiteren Versuchen konnte bestätigt werden, daß der Efflux auf Aktivitätsebene ausschließlich osmotisch reguliert wird.

Wenn der Efflux unabhängig von der osmoprotektiven Substanz ist, sollte sich in Anwesenheit von Prolin und Glycinbetain nach hypoosmotischem Schock der gleiche lineare Zusammenhang zwischen interner Solut-Konzentration und externer Osmolalität einstellen wie bei Beladung mit nur einer Substanz. Zu diesem Zweck wurden die Zellen gleichzeitig mit Prolin und Glycinbetain beladen. Dabei wurden drei verschiedenen Versuchsansätze gewählt, bei denen die kompatiblen Solute entweder abwechselnd oder gleichzeitig radioaktiv markiert waren.

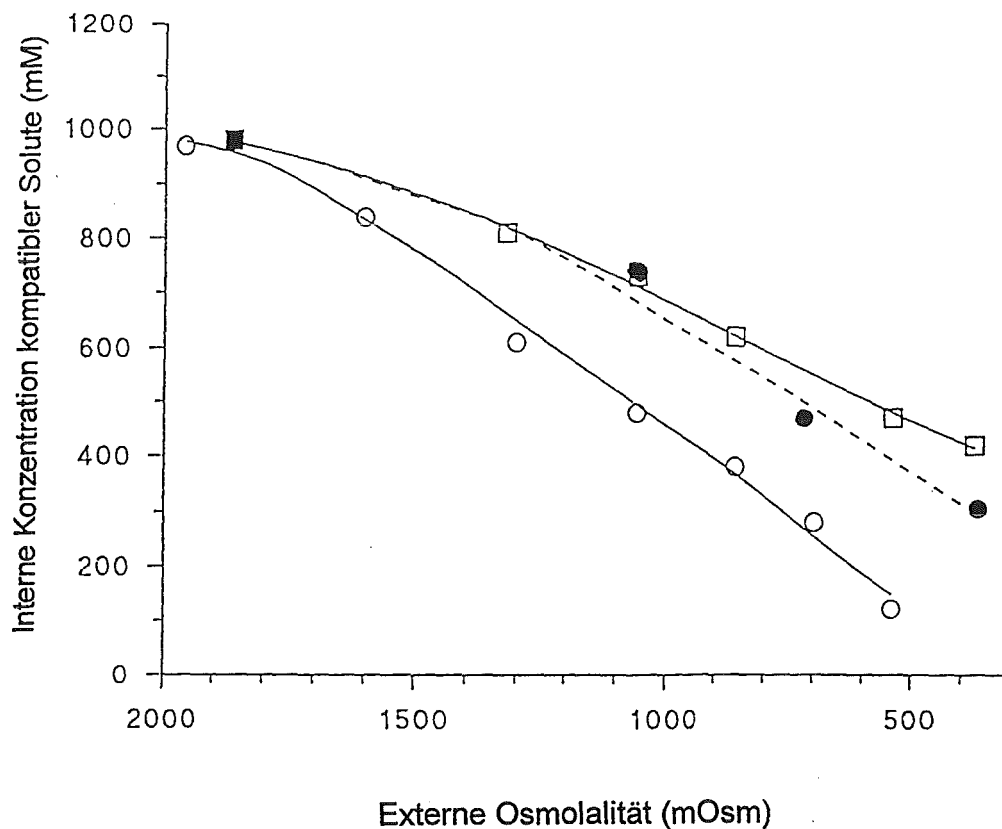


Abb. 12: Korrelation des internen Gehalts kompatibler Osmolyte zur externen Osmolalität nach hypoosmotischem Schock. Die Zellen wurden osmotisch gestreßt, wie unter 2.4.2 beschrieben. Die aufgeführten Werte repräsentieren die interne Konzentration der jeweiligen osmoprotektiven Substanz 1 Minute nach Applikation des hypoosmotischen Schocks. Die Zellen wurden entweder mit Prolin (□) oder mit Glycinbetain (●, ○) beladen, als externe Osmolyte diente NaCl (○) oder Sorbitol (●).

Da die Aufnahme-Systeme für beide Substanzen unterschiedlich effektiv arbeiten (Peter, 1997), wurde eine doppelt so hohe Prolin- (2 mM) wie Glycinbetain-Konzentration (1 mM) zur Beladung der Zellen eingesetzt, um zu Beginn des Experimentes vergleichbare interne Konzentrationen der beiden Substanzen zu erreichen.

Es zeigt sich, daß die internen Konzentrationen von Prolin und Glycinbetain vergleichbar waren. In den Ansätzen, in denen die Solute jeweils einzeln markiert waren, lag in den Zellen eine anfängliche Konzentration um 600 mM vor. In dem Ansatz, in dem beide Substanzen markiert waren, ergab sich eine interne Konzentration von 1200 mM, also eine genau doppelt so hohe Konzentration. Beide, Gesamtkonzentration und Einzelkonzentrationen, zeigten eine lineare Abhängigkeit von der externen Osmolalität (Abb. 13).

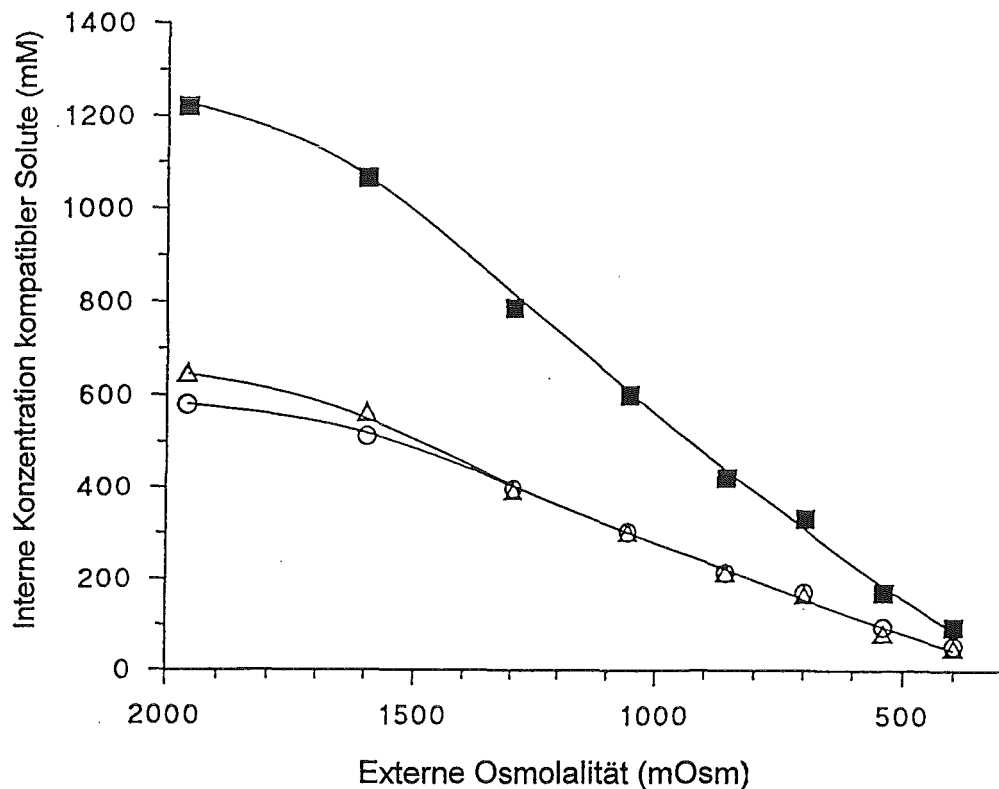


Abb. 13: Interne Konzentration von Glycinbetain und Prolin bei gleichzeitiger Beladung in Abhängigkeit der externen Osmolalität. Die Zellen wurden bei einer OD_{600} von 5 mit Prolin (2 mM), Glycinbetain (1 mM) oder einer Mischung aus beiden Substanzen beladen. NaCl diente als externe osmotisch aktive Substanz. Dargestellt ist die interne Konzentration von Prolin (○), Glycinbetain (△) und von beiden Substanzen (■).

Die Regulation auf Aktivitätsebene konnte ebenfalls sehr eindrucksvoll gezeigt werden, wenn die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen osmoprotektiver Substanzen vorbe-laden wurden, wie in Abb. 14 dargestellt. Zellen von *C. glutamicum* wurden im gleichen Zeit-raum mit verschiedenen Glycinbetain-Konzentrationen inkubiert. Das führte entweder zu einer Sättigung des internen Glycinbetain-Pools (800 mM) und somit komplett adaptierten Zellen, oder zu einer unvollständigen Beladung der Zellen (400 mM und 200 mM).

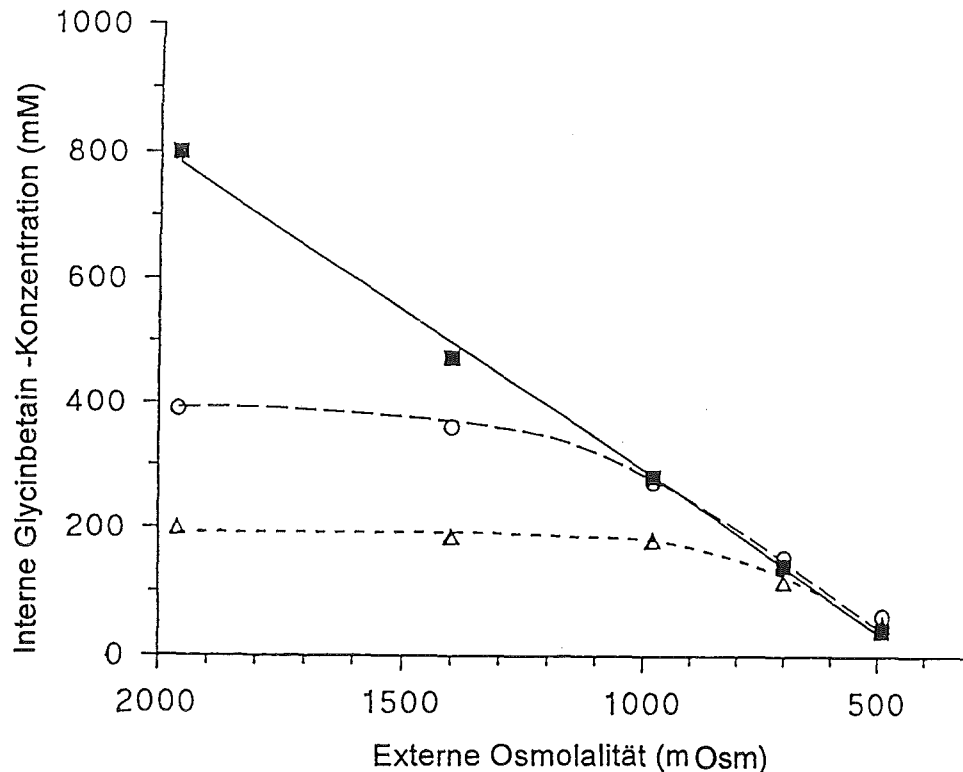


Abb. 14: Efflux von Glycinbetain nach unterschiedlicher Beladung der Zellen. Die Zellen wurden behandelt wie unter 2.4.2 beschrieben. Zur Beladung wurden sie bei einer OD_{600} von 5 mit radioaktiv markiertem Glycinbetain mit einer Konzentration von 2 mM (■), 1 mM (○) oder 0.5 mM (△) inkubiert. Dargestellt ist die Glycinbetain-Konzentration in den Zellen nach hypoosmotischem Schock.

In diesen Fällen sind die Zellen nicht adaptiert, d.h. ihr Turgor ist nicht optimal. Bei dem anschließend erfolgenden hypoosmotischen Streß reagierten die Zellen entsprechend ihrer Vorbeladung unterschiedlich. Das Efflux-System wurde erst aktiv, d.h. ein Ausschleusen von Glycinbetain konnte erst dann festgestellt werden, wenn die osmotische Potentialdifferenz über den Zellmembranen und damit das anschließend einströmende Wasser einen bestimmten Wert erreicht hatte. Dieser Wert korrelierte mit der Größe des akkumulierten Substrat-Pools. Er ist z.B. für die mit 400 mM Glycinbetain beladene Zellpopulation bei einer externen Osmolalität von 1000 mOsm, bei der mit 200 mM beladenen Population bei einer externen Osmolalität von 700 mOsm erreicht. Nachdem diese Aktivierungsschwelle des Effluxsystems erreicht ist, sind die Reaktionen der verschiedenen Zellpopulationen auf weiteren hypoosmotischen Streß nicht mehr voneinander zu unterscheiden.

3.1.3.2 Regulation der Expression

Das Efflux-System von *C. glutamicum* wird auf Aktivitätsebene durch die vorherrschenden osmotischen Bedingungen reguliert. Es stellt sich die Frage, ob auch auf Expressionsebene eine Regulation stattfindet, oder ob das System konstitutiv exprimiert wird. Um dies zu untersuchen, wurden die Bakterienzellen in Medien unterschiedlicher Osmolalität angezogen, unter hyperosmotischen Bedingungen mit Glycinbetain beladen und in niederosmolalem Puffer resuspendiert. Der Gehalt an Glycinbetain in den Zellen bei der jeweiligen externen Osmolalität ist in Abb. 15 dargestellt. Je nach Vorbehandlung enthielten die Zellen zu Beginn des Versuchs, also bei isoosmotischer Behandlung (1960 mOsm) unterschiedlich große Mengen an Glycinbetain. Bei den hypoomotischen Verdünnungen konnten jedoch keine Unterschiede zwischen den jeweiligen Populationen festgestellt werden. Es zeigt sich also, daß die Akkumulation von Glycinbetain von den Kultivierungsbedingungen abhängig ist. Je höher die Osmolalität des Anzucht-Mediums, desto höher ist der akkumulierte Glycinbetain-

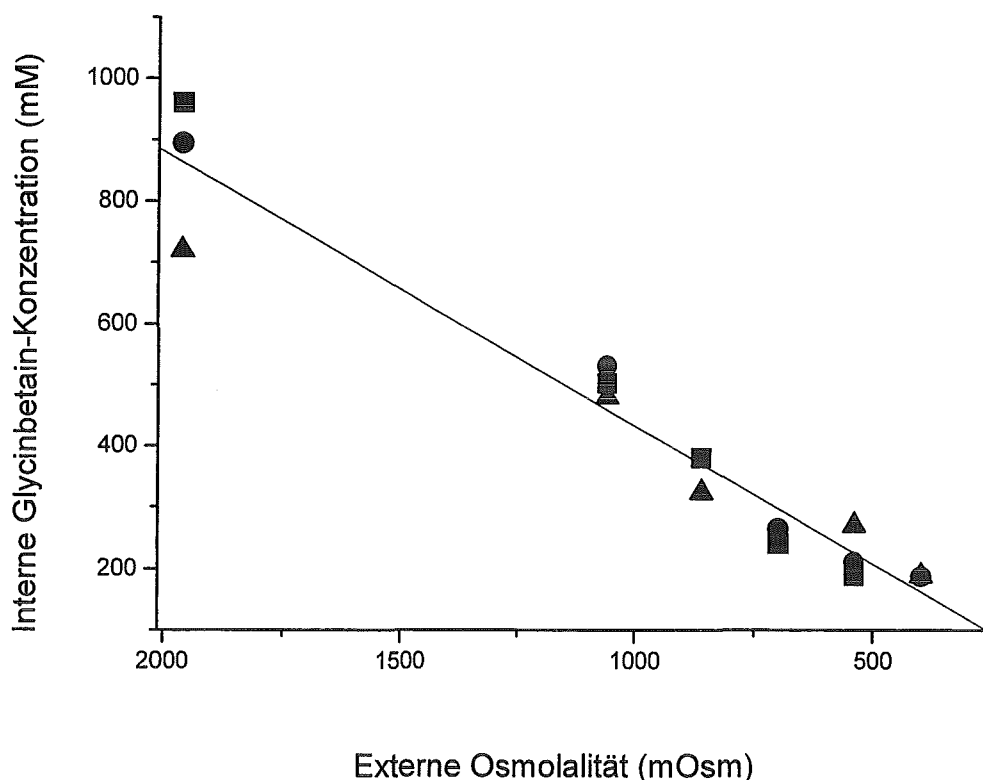


Abb. 15: Hypoosmotischer Efflux nach unterschiedlichen Wachstumsbedingungen.

Die Zellen wurden behandelt, wie unter 2.4.2 beschrieben. Unterschiede waren gegeben durch unterschiedliche NaCl-Konzentrationen im Anzuchtmedium, nämlich 0,5 M NaCl (▲), 0,75 M (●) oder 1 M (■) NaCl. Dargestellt ist die interne Glycinbetain-Konzentration 1 Minute nach osmotischem Schock, korrigiert für das jeweilige cytoplasmatische Volumen.

Pool unter identischen Bedingungen. Das Effluxsystem ist jedoch unabhängig von den Wachstumsbedingungen aktiv, es wird von den Zellen also konstitutiv exprimiert.

3.1.4. Der osmotisch induzierte Efflux erfolgt über Kanäle, nicht über Carrier-Proteine

Welche Membrankomponenten sind für den beobachteten osmotisch induzierten Efflux verantwortlich? Im Prinzip könnte er durch defekte Zellmembranen, die aufgrund des starken Drucks auf die Membran disruptiert sind, ebenso vermittelt werden wie durch Kanal- oder Carrierproteine. Ersteres kann allerdings als Ursache für den Export infolge seiner beobachteten Spezifität ausgeschlossen werden (vergl. 3.1.5). Daher bleibt die Frage, ob ein Carrier-, ein Kanalprotein, oder beide Typen von Membranproteinen bei der osmotischen Regulation involviert sind. Die Schnelligkeit der beobachteten Transportrate (vergl. Kapitel 3.1.2) macht die Beteiligung eines Carrier-Mechanismus unwahrscheinlich. Für einen Kanal spricht ebenfalls die Tatsache, daß bei isoosmolarer Resuspendierung der Zellen trotz des hohen Gradienten kein signifikanter Efflux beobachtet werden konnte. Um experimentell zu zeigen, daß Kanal- und nicht Carrier-Proteine für den hypoosmotisch vermittelten Efflux verantwortlich sind, wurde der Einfluß von unmarkiertem Substrat auf der *trans*-Seite der Membran, d.h. auf der Seite, in deren Richtung der Transport fließt, in diesem Fall also die äußere Seite, überprüft. Während der Flux durch einen Kanal in Anwesenheit von *trans*-Substrat durch Verringerung des Konzentrationsgradienten eher inhibiert wird, führt dies bei Beteiligung eines Carriers zu einer Steigerung des Efflux, da sich die Austauschrate von unmarkiertem (Aufnahme) und markiertem (Efflux) Substrat erhöht. Die Anwesenheit des unmarkierten Substrats sollte also zu einer Steigerung des Efflux des markierten Substrats nach hypoosmotischem Schock bzw. zur Induktion dieses Efflux bei geringem oder fehlendem osmotischem Gradienten führen.

Zunächst wurde untersucht, welche Wirkung die Zugabe von Transportsubstrat bei kurzfristig hypoosmotisch aktiviertem Efflux hat, also unter Bedingungen wie in Abb. 9 beschrieben. Die Zellen wurden in hyperosmotischem Puffer mit radioaktiv markiertem Glycinbetain beladen und anschließend in unterschiedlich osmolalem Puffer aufgenommen, der entweder Glycinbetain-frei war oder 2 mM des Osmolytes enthielt. Wie aus Abb. 16 hervorgeht, konnte kein signifikanter Unterschied im Ausmaß oder Zeitverlauf des Efflux zwischen den beiden Ansätzen festgestellt werden. Im Falle des stärksten hypoosmotischen Schocks waren beide Verläufe nicht voneinander zu unterscheiden. Der geringfügig verstärkte Efflux in Anwesenheit eines Überschusses unmarkierten Substrats im Medium ist auf die Aktivität des Glycinbetain-Aufnahmesystems BetP zurückzuführen (Peter *et al.*, 1996), das sich unter diesen Umständen auf einen neuen Gleichgewichtszustand einstellt und dabei internes, markiertes Glycinbetain gegen externes unmarkiertes Glycinbetain austauscht.

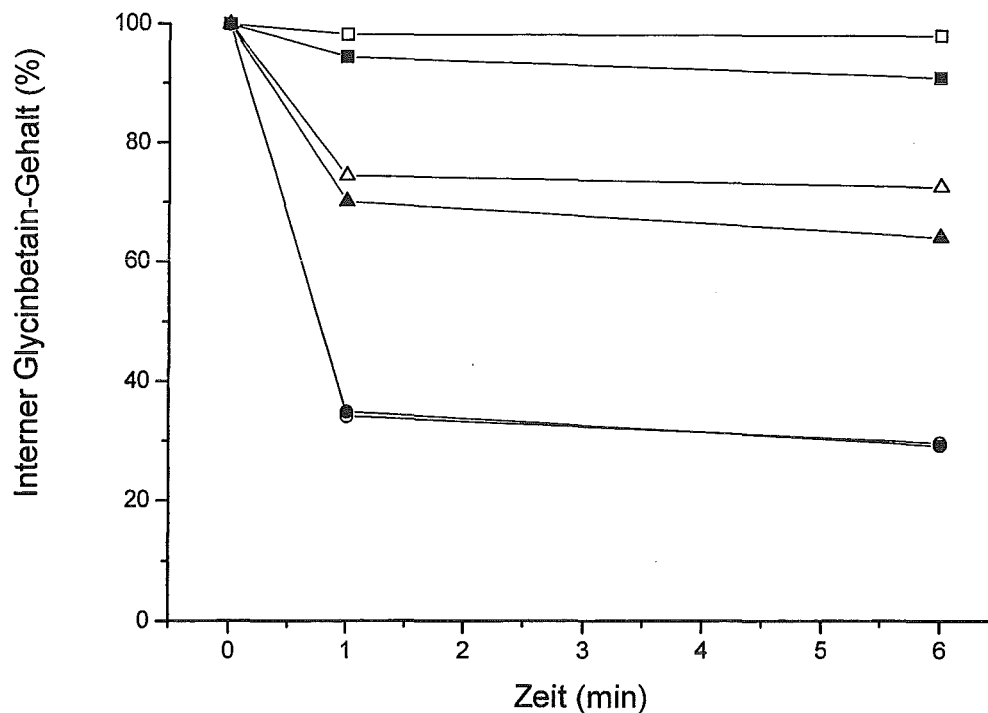


Abb. 16: Einfluß von externem Substrat auf den durch hypoosmotisch Schock induzierten Efflux. Nach Beladung mit Glycinbetain wurden die Zellen in Pufferlösungen folgender Osmolalitäten aufgenommen: 1860 mOsM (■, □), 1060 mOsM (▲, △), und 540 mOsM (●, ○). Der hypoosmotische Schock erfolgte entweder in Anwesenheit (geschlossene Symbole) oder in Abwesenheit (offene Symbole) von 2 mM unmarkiertem Glycinbetain. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die relativen Werte dargestellt, die absoluten Anfangskonzentrationen lagen zwischen 610 und 670 mM.

In *Lactobacillus plantarum* wurde gezeigt, daß der hypoosmotisch induzierten Efflux in zwei kinetische Komponenten unterschieden werden kann, nämlich in einen schnellen Efflux mit einer Halbwertszeit unterhalb von ca. 2 s, und einen anschließend erfolgenden langsamen Efflux mit einer Halbwertszeit von 4-5 min (Glaasker *et al.*, 1996). Während der schnelle Efflux einem Kanal zugeschrieben wird, erfolgt der langsame Efflux vermutlich Carrier-vermittelt. Um sicherzustellen, daß das Efflux-System in *C. glutamicum* neben der bereits beobachteten schnellen Komponente nicht auch noch eine langsame Komponente enthält, die unter den bisherigen Versuchsbedingungen übersehen worden sein könnte, wurde der Efflux von Glycinbetain aus den Zellen über einen längeren Zeitraum verfolgt, und zwar sowohl

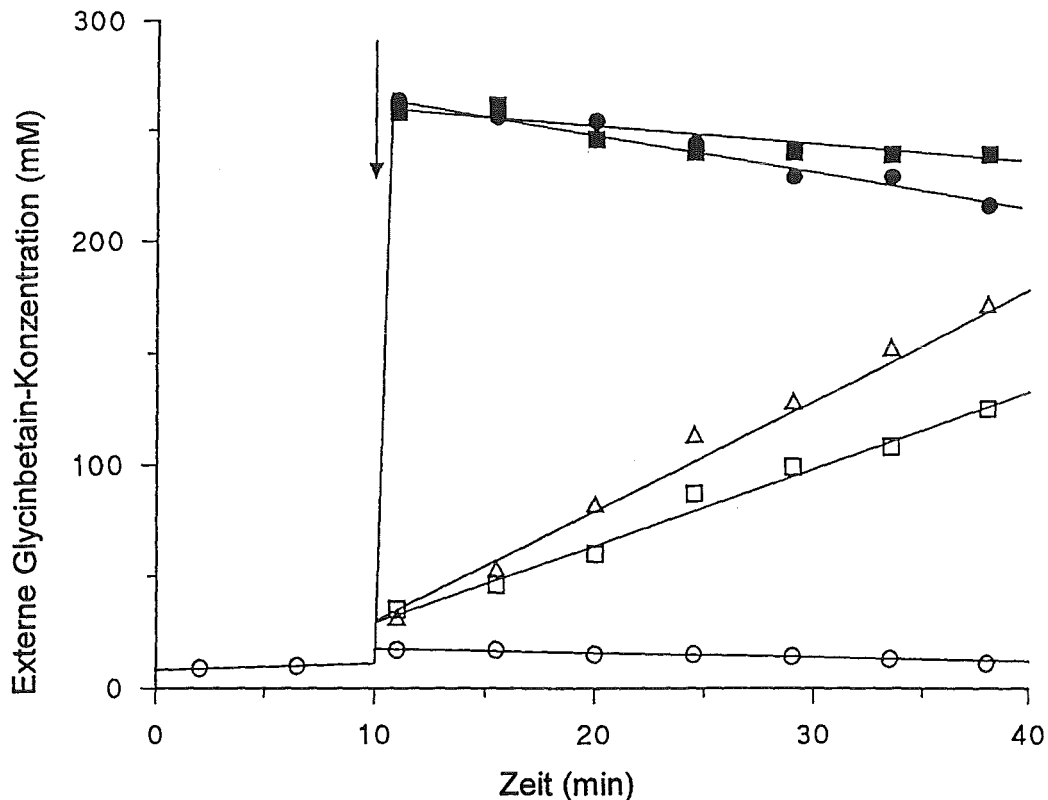


Abb. 17: Glycinbetain-Efflux unter isoosmotischen Bedingungen und nach hypoosmotischem Schock. Die Zellen wurden mit radioaktiv markiertem Glycinbetain bei einer Osmolalität von 1450 mOsM beladen wie unter 2.4.2.2 beschrieben. Nach Waschen bei gleicher Osmolalität wurden die Zellen bei 1450 mOsM unter Rühren in einem belüfteten Becherglas inkubiert. Nach einer Adaptationsphase von 10 Minuten (Pfeil) wurden isoosmolarer Puffer (○), isoosmolarer Puffer mit 4 mM Glycinbetain (□) oder 40 μ M CCCP (Δ), sowie hypoosmolarer Puffer (zum Einstellen einer Osmolalität von 805 mOsM) einmal mit 4 mM Glycinbetain (■), einmal ohne Zugabe von externem Substrat (●) zugegeben. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und der Gehalt von interner und externer Markierung bestimmt. Die völlige Freisetzung von internem Glycinbetain durch Lyse der Zellen mittels 1 % CTAB führte zu einer externen Konzentration von 560 μ M.

unter isoosmotischen Bedingungen als auch nach hypoosmotischem Schock in An- und Abwesenheit externen Substrats. In Abb. 17 ist die Glycinbetain-Konzentration im Medium unter den genannten Bedingungen dargestellt.

Ohne Zugabe von externem Substrat findet unter isoosmotischen Bedingungen keine weitere Veränderung des internen Glycinbetain-Pools statt (Abb. 17; ○), der externe Gehalt an radioaktiv markiertem Glycinbetain ist gleichbleibend niedrig. Nach hypoosmotischem Schock (Abb. 17; ●) tritt schlagartig eine größere Substanzmenge aus, die externe Glycin-

betain-Konzentration steigt von 10 μM auf 260 μM an. Das entspricht ungefähr der Hälfte der gesamten, vorher akkumulierten Menge des kompatiblen Soluts, da sich nach Lyse der Zellen mit CTAB eine Glycinbetain-Konzentration von 560 μM im Puffer nachweisen lies. Die Glycinbetain-Konzentration im Puffer nimmt im weiteren Verlauf langsam wieder ab, was auf eine geringfügige Aufnahmeaktivität schließen läßt. Wird nun unmarkiertes Substrat ins Medium gegeben, hat dies auf den Efflux nach hypoosmotischem Schock keine Auswirkungen (Abb. 17; ■), der Gehalt der markierten Substanz steigt im Medium genauso wie bei der Kontrolle. Allerdings kann in diesem Fall keine Wiederaufnahme beobachtet werden, da die radioaktiv markierten Glycinbetain-Moleküle durch Zugabe der unmarkierten Substanz stark verdünnt worden sind und bevorzugt unmarkierte Moleküle importiert werden, die Markierung verbleibt im Medium. Im Gegensatz zu dieser Beobachtung ist unter isoosmotischen Bedingungen bei Zugabe von unmarkiertem Osmolyt tatsächlich ein Efflux von [^{14}C]-Glycinbetain zu beobachten (Abb. 17; □). Die Effluxrate beträgt allerdings nur $3,5 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g TM}^{-1}$ und verläuft damit drei Größenordnungen langsamer als der osmotisch ausgelöste Efflux. Dieser langsame Efflux ist mit der Reversibilität des BetP-Systems zu erklären, das in seiner Eigenschaft als sekundäres Transportsystem im thermodynamischen Gleichgewicht einen kontinuierlichen Austausch von internem und externem Substrat ermöglicht. Durch die Zugabe von externem Substrat wird die Wiederaufnahme des nun stark verdünnten markierten zugunsten der Aufnahme von unmarkiertem Substrat eingestellt, man beobachtet deshalb einen scheinbaren Efflux von [^{14}C]-Glycinbetain.

Um dieses Argument weiterhin experimentell zu unterstützen, wurde 10 min nach Beginn des Versuchs der Entkoppler Carbonylcyanid-*m*-Chlorophenylhydrazon (CCCP) zu den Bakterienzellen gegeben (Abb. 17; Δ). CCCP bewirkt, daß das Membranpotential, also die treibende Kraft des sekundären Transportsystems BetP, kollabiert. Bei Zugabe von CCCP kann daher ebenfalls ein langsamer Efflux von Glycinbetain in Richtung des Konzentrationsgefälles beobachtet werden, da die Wiederaufnahme nicht mehr möglich ist.

3.1.5 Die Spezifität der hypoosmotisch aktivierten Efflux-Kanäle

Bei Untersuchungen der Osmoregulation in *E. coli* wurde festgestellt, daß nach moderaten hypoosmotischen Schock in einem spezifischen Prozeß lediglich die kompatiblen Solute K^+ , Glutamat und Trehalose austreten (Schleyer *et al.*, 1993). Dieser Transportprozeß wird bei starkem hypoosmotischem Streß allerdings unspezifisch, alle niedermolekularen Substanzen und selbst große Moleküle wie ATP werden ausgeschleust (Tsapis und Kepes, 1977; Berrier *et al.*, 1992). Um die Spezifität des osmotisch aktivierten Kanals bei *C. glutamicum* zu untersuchen, wurde der Efflux einer Reihe niedermolekularer Substanzen gemessen. Zu den untersuchten Molekülen gehörten neben den typischen kompatiblen Soluten Glycin-

betain, Prolin und Ectoin strukturverwandte Moleküle wie die drei Aminosäuren Alanin, Lysin und Glutamat; des weiteren Ionen (Na^+ und K^+) und ATP. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

3.1.5.1 Efflux der kompatiblen Solute

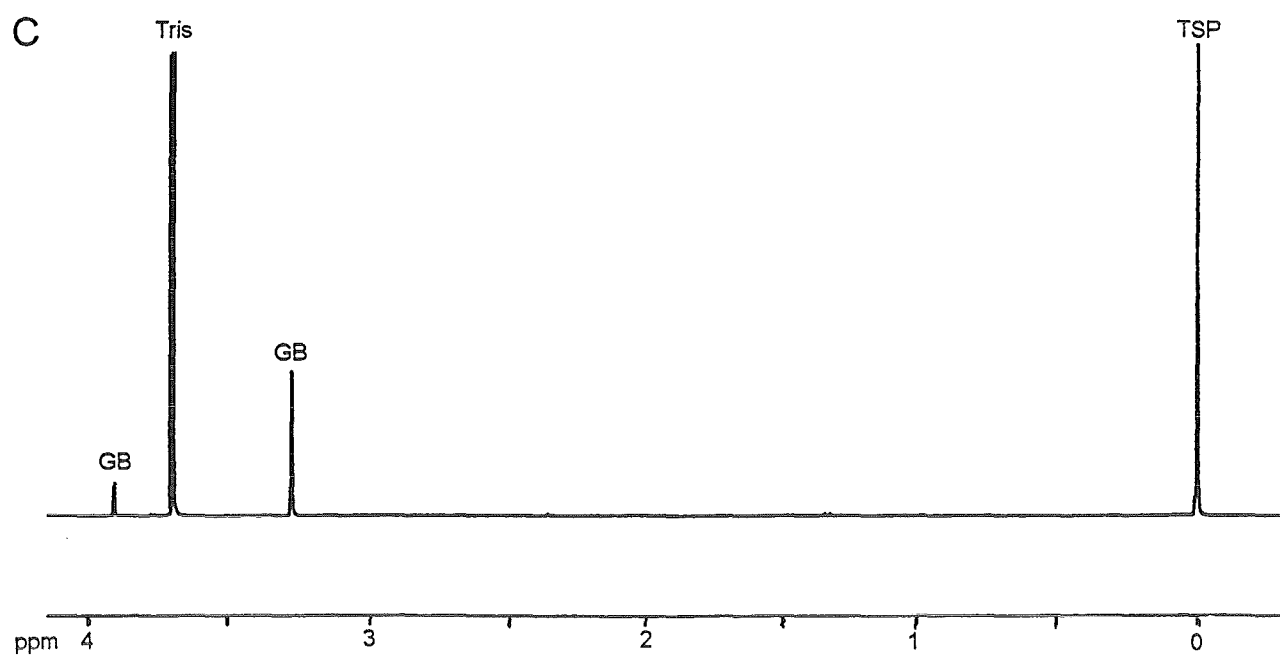
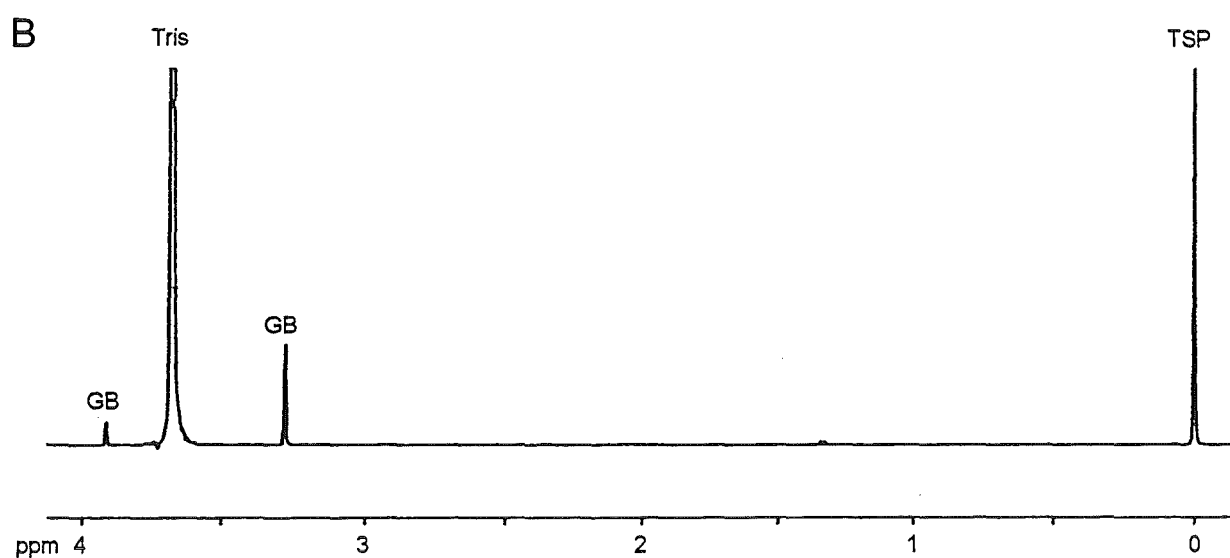
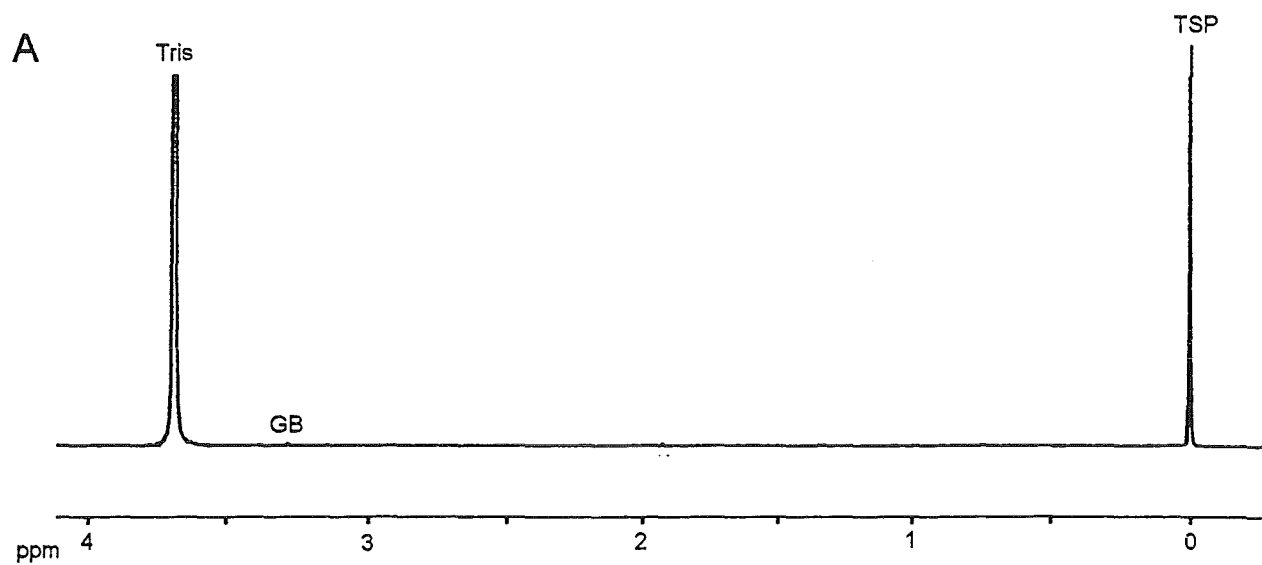
Glycinbetain ist das am weitesten verbreitete kompatible Solut und in Bezug auf seine osmoprotektive Kapazität noch effektiver als Prolin (Imhoff, 1986). Die Aminosäure Ectoin, ebenfalls als osmoprotektive Substanz weit verbreitet (Imhoff, 1986), schützt bei *E. coli* genauso effektiv vor osmotischem Streß wie Glycinbetain (Jebbar *et al.*, 1992). Auch *C. glutamicum* verfügt über ein Aufnahmesystem für diese Substanz, das ebenfalls osmotisch reguliert ist (Peter, 1997). Deshalb war es von Interesse herauszufinden, ob und wie Ectoin unter hypoosmotischen Bedingungen ausgeschleust wird. Da zum Zeitpunkt der Messungen kein radioaktiv markiertes Ectoin zur Verfügung stand, wurde der Gehalt an internem und externem Substrat mittels NMR-Spektrometrie bestimmt. Zur Kontrolle wurde der Versuch zunächst mit Glycinbetain analog zu den vorher beschriebenen Effluxmessungen durchgeführt (vergl. 3.1.2). Dazu wurden die Zellen in hyperosmotischem Puffer mit Glycinbetain beladen. Nach anschließendem hypoosmotischem Schock wurden die Zellen mittels Filtration vom umgebenden Medium getrennt und der Substratgehalt im Filtrat direkt NMR-spektroskopisch untersucht. Abb. 18 zeigt die ^1H -NMR-Spektren der Filtrate der mit Glycinbetain beladenen Zellen nach isoosmotischer Verdünnung, nach hypoosmotischem Schock von 1860 mOsm auf 540 mOsm, sowie das Spektrum des Gesamtgehalts nach vollständiger Lyse der Zellen mit CTAB. Während die für Glycinbetain typischen *peaks* (3,3 ppm und 3,9 ppm, s. auch 2.4.7) unter isoosmotischen Bedingungen kaum oder gar nicht zu erkennen sind (A), zeigt sich, daß nach hypoosmotischem Schock der Großteil des internen Glycinbetains ausgetreten ist (B, C). Der jeweilige Glycinbetain-Gehalt der Zellen, der aus dem Integral der *peak*-Fläche berechnet wurde, ist in Abb. 20 dargestellt. Dieser Versuch bestätigt zum einen die Ergebnisse, die mit den radioaktiv markierten Substraten gewonnen wurden. Darüber hinaus wird mit dieser Methode gezeigt, daß keine anderen organischen außer den speziellen osmoprotektiven Substanzen an der hypoosmotischen Regulation in *C. glutamicum* beteiligt sind. Außer Spuren von Lactat, Acetat und Glutamat wurden keine weiteren organischen Substanzen in den Filtraten detektiert.

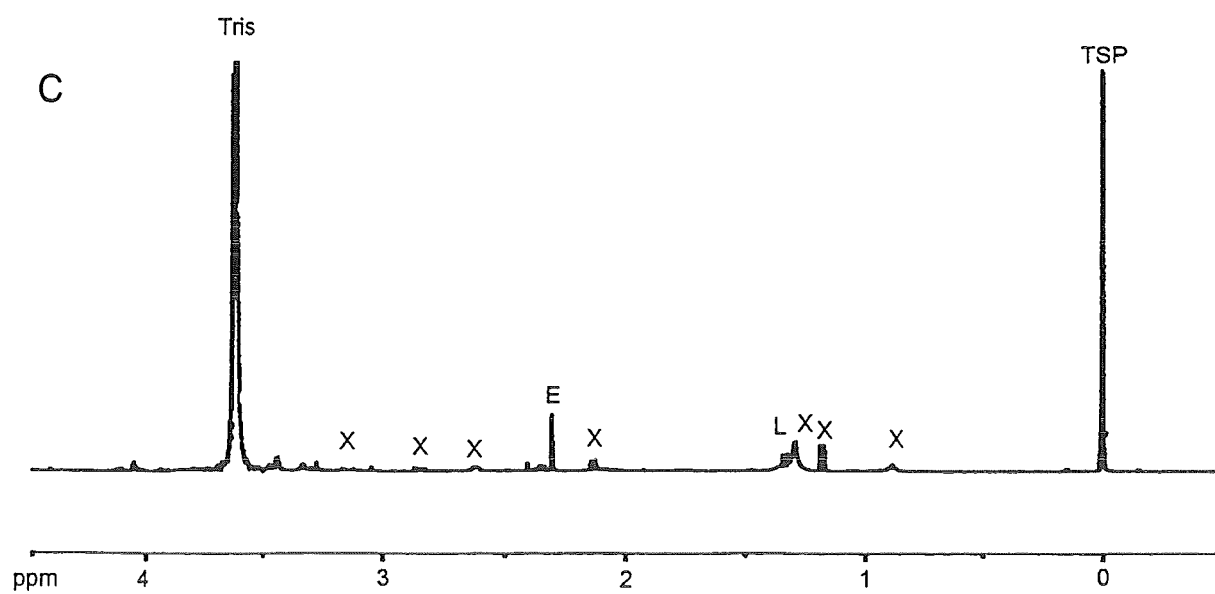
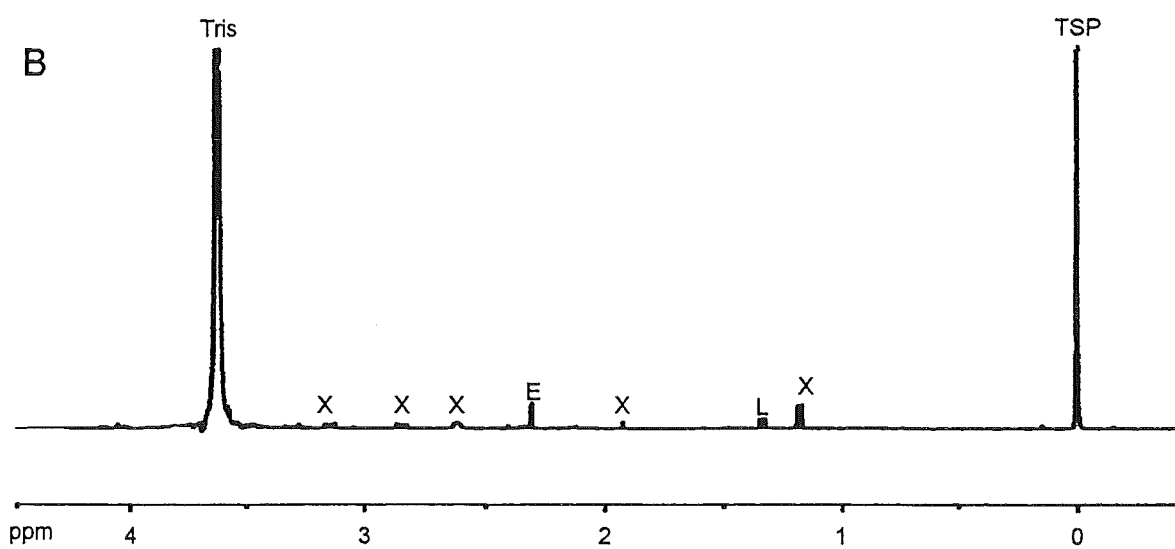
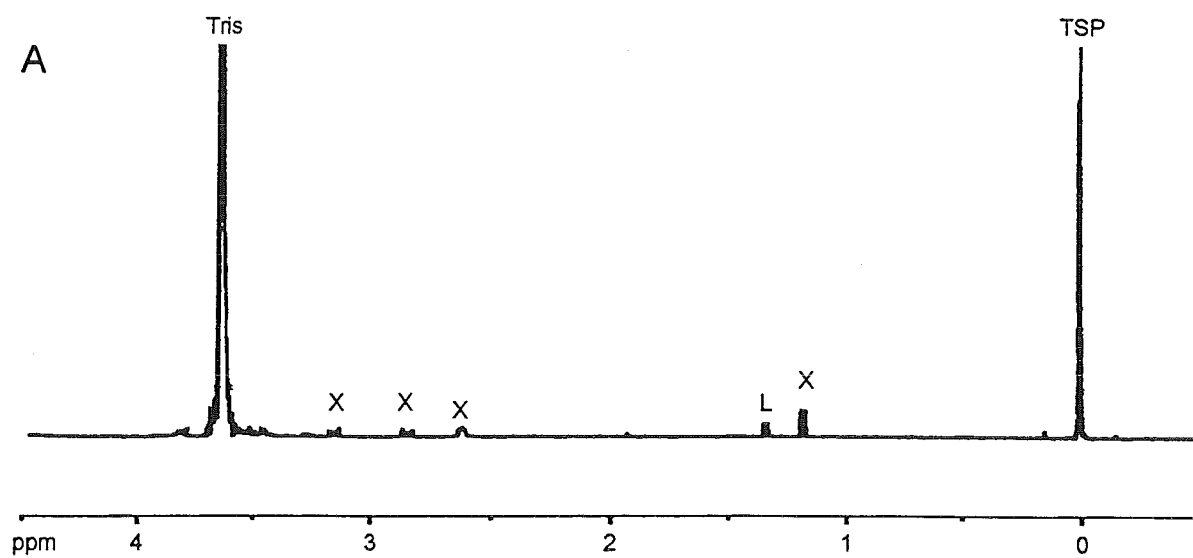
Ectoin wird im Vergleich zu Glycinbetain nicht so effizient ausgeschleust (Abb. 19, 20). Während Glycinbetain nach starkem hypoosmotischem Schock von 1960 mOsm auf 540 mOsm vollständig ausgeströmt ist, verbleibt Ectoin zu 56 % in den Zellen. In den NMR-Spektren tauchen außer Lactat noch weitere, unbekannte Substanzen auf, deren Erscheinen jedoch nicht osmotisch reguliert ist, da sie bereits unter isoosmotischen Bedingungen zu beobach-

ten sind (Abb. 19 A). Die Beladung mit Glycinbetain ist in diesem Versuch geringer als die mit Ectoin. Auch im Vergleich mit den Versuchen mit radioaktiv markierten Molekülen zeigt sich, daß die Beladung mit Glycinbetain unvollständig erfolgt ist. Dort wurden nämlich Glycinbetain-Anfangskonzentrationen um 0,92 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ TM bestimmt, unter osmotischem Streß verblieben ca. 30 % der Moleküle in den Zellen (s. Tab. 4). Der augenscheinlich effektivere Efflux von Glycinbetain könnte auf die schlechtere Beladung zurückzuführen sein. Deshalb wurde der Efflux von Glycinbetain und Ectoin gemessen, als die Zellen mit beiden Soluten gleichzeitig beladen worden waren, also unter kompetitiven Bedingungen. Wurden die Zellen unter diesen Umständen hypoosmotisch geschockt, zeigt sich, daß Glycinbetain tatsächlich stärker ausgeschleust wird als Ectoin (Abb. 21).

Abb. 18 (S. 45): ^1H -NMR-Spektren des Zellmediums von Zellen, die mit Glycinbetain beladen waren, nach unterschiedlicher Behandlung. Zellen von *C. glutamicum* wurden angezogen wie unter 2.4.2 beschrieben und unter hyperosmotischen Bedingungen mit Glycinbetain beladen. Nach Resuspension der Zellen in isoosmotischem Puffer (1860 mOsm, A), hypoosmotischem Puffer (540 mOsm, B) oder Lyse der Zellen mit 1 % CTAB (C) wurden die Überstände filtriert, lyophilisiert, in $^2\text{H}_2\text{O}$ gelöst, mit 2 mM TSP als internem Standard versetzt und das Spektrum aufgenommen, wie unter 2.4.7 beschrieben. Dargestellt sind die Protonen-Resonanzfrequenzen der Substituenten (ppm) in Verschiebung zur Frequenz von Natrium-3-Trimethylsilyl-[2,2',3,3'-D₄]-Propionat (TSP, 0 ppm). Die hier detektierten *peaks* bei 3,3 ppm und 3,9 ppm (GB) sind mit den *peaks* des Standardspektrums von Glycinbetain identisch (s. Abb. 5 A). Der *peak* bei 3,7 ppm ist den Protonen des Puffermoleküls Tris zuzuschreiben. Außerdem sind Spuren von Lactat (1,4 ppm), Glutamat (2,3/ 2,4 ppm) und Acetat (2,9 ppm) zu erkennen (B, C).

Abb. 19 (S. 46): ^1H -NMR-Spektren des Zellmediums von Zellen, die mit Ectoin beladen waren, nach unterschiedlicher Behandlung. Bedingungen wie Abb. 18, außer daß die Zellen mit Ectoin beladen wurden. Nach Resuspension in isoosmotischem Puffer (1860 mOsm, A), hypoosmotischem Puffer (540 mOsm, B) oder Lyse der Zellen mit 1 % CTAB (C) wurden die Überstände filtriert, lyophilisiert, in $^2\text{H}_2\text{O}$ gelöst, mit 2 mM TSP als internem Standard versetzt und das Spektrum aufgenommen. Dargestellt sind die Protonen-Resonanzfrequenzen der Substituenten in Verschiebung zur Frequenz von TSP (0 ppm). Der Ectoin-*peak* (E) erscheint bei 2,5 ppm (vergl. 2.4.7). Der *peak* bei 3,7 ppm ist den Protonen des Puffermoleküls Tris zuzuschreiben. Außerdem sind Spuren von Lactat (L, 1,4 ppm), und einigen unbekannten Substanzen (X) zu erkennen (A, B, C).





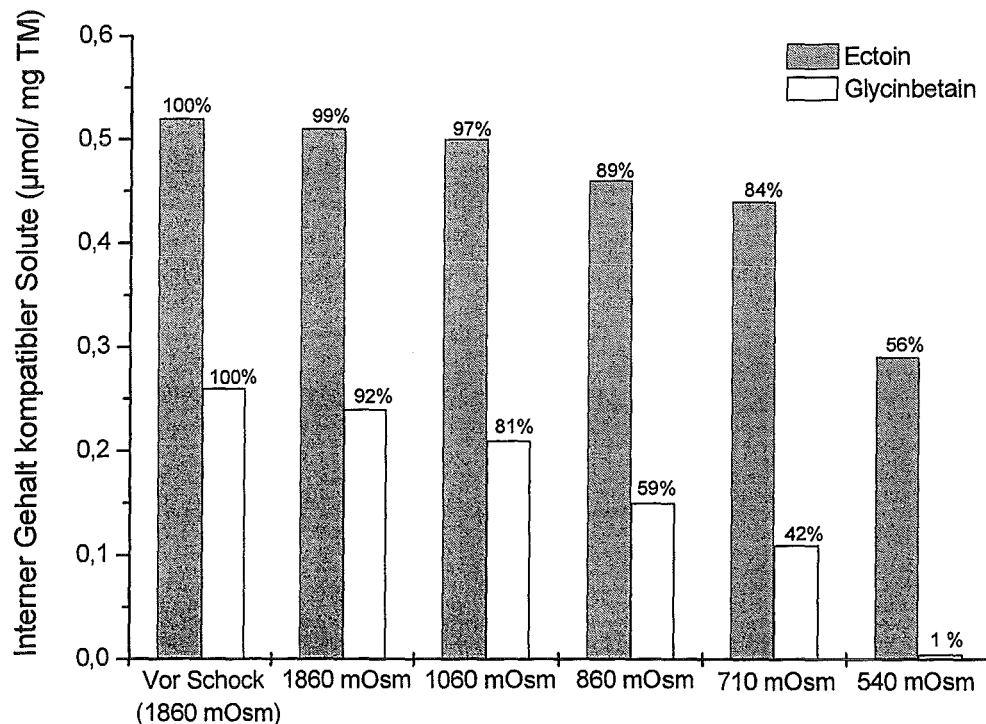


Abb.20: Osmotisch induzierter Efflux von Ectoin und Glycinbetain. Die Zellen wurden unter hyperosmotischen Bedingungen (1860 mOsm) entweder mit Ectoin oder mit Glycinbetain beladen und nachfolgend in Pufferlösungen mit den angegebenen Osmolalitäten resuspendiert. 1 Minute nach hypoosmotischem Schock wurde der Gehalt der Substanzen in den Überständen mittels NMR bestimmt. Der Gesamtgehalt der kompatiblen Solute in den Zellen vor osmotischem Schock wurde nach Zellyse mit 1 % CTAB ermittelt.

Aus den Messungen geht zunächst hervor, daß Ectoin wiederum effektiver aufgenommen wurde als Glycinbetain (Abb. 21). Der Ectoin-Gehalt der Zellen machte nach Beladung 61 % der kompatiblen Solute aus, der Glycinbetain-Gehalt nur 39 %. Nach starkem hypoosmotischem Schock von 1860 mOsm auf 540 mOsm hatte sich dieses Verhältnis noch stärker in die Richtung des Ectoin-Gehalts verschoben. Der in den Zellen verbleibende kompatible Solut-Pool wurde zu 96 % von Ectoin gestellt, Glycinbetain ist fast vollständig ausgeschieden worden. Könnten beide Substanzen den Kanal gleich gut passieren, würde man nach hypoosmotischem Streß ein gleiches Verhältnis der Substanzen zueinander wie vor dem Schock erwarten. Die vorhergehenden Versuche zur Regulation zeigten, daß dieser Unterschied bei Glycinbetain und Prolin nicht zu beobachten war (vergl. Abb. 13). Beide osmoprotektiven Substanzen können den Kanal offensichtlich mit gleicher Effizienz passieren, was für Ectoin nicht der Fall ist.

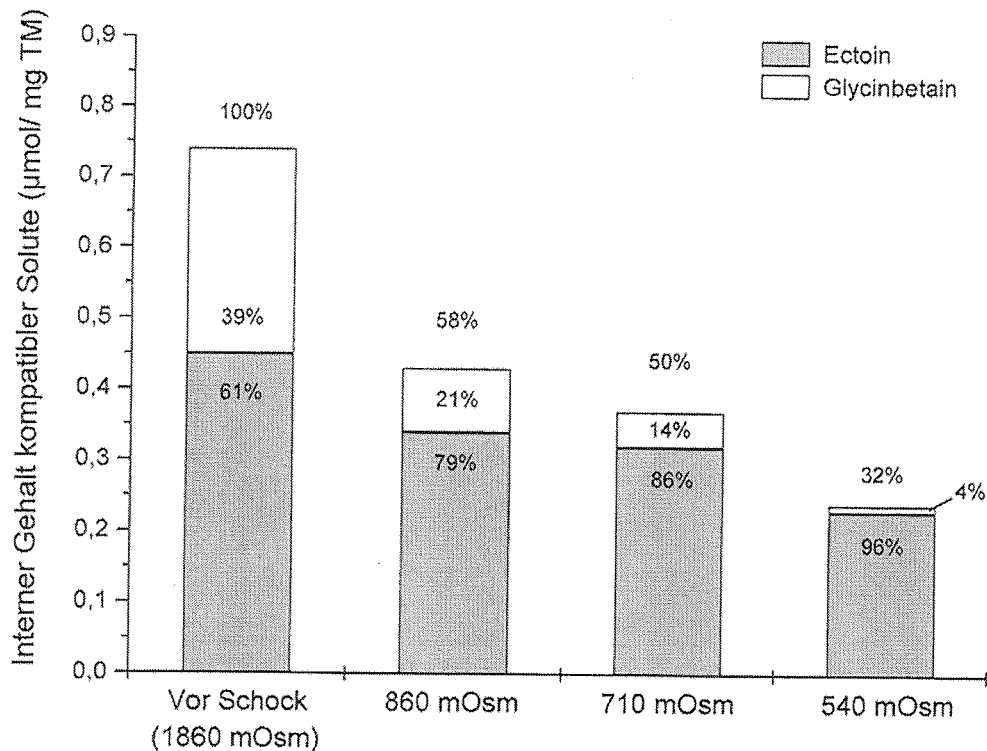


Abb. 21: Gehalt kompatibler Solute in den Zellen nach gleichzeitiger Beladung mit Glycinbetain und Ectoin und anschließendem osmotischem Streß. Die Zellen wurden mit Ectoin und Glycinbetain beladen und ausgehend von den hyperosmotischen Bedingungen (1860 mOsm) in Pufferlösungen mit den angegebenen Osmolalitäten resuspendiert. 1 Minute nach hypoosmotischem Schock wurde der Gehalt der Substanzen in den Überständen mittels NMR bestimmt. Der Gesamtgehalt der kompatiblen Solute in den Zellen vor hypoosmotischem Schock wurde nach Zelllyse mit 1 % CTAB ermittelt. Oberhalb der Balken ist der relative Gesamtgehalt an kompatiblen Soluten angegeben, in den Balken ihr Einzelanteil am Gesamtgehalt.

3.1.5.2 Efflux anderer Aminosäuren

Um das osmotisch induzierte Effluxverhalten anderer strukturverwandter Moleküle mit dem der kompatiblen Solute Glycinbetain und Prolin zu vergleichen, wurden die Zellen von *C. glutamicum* mit Glycinbetain und dem Dipeptid L-lysiny-L-Alanin beladen, aus dem nach Aufnahme über Dipeptid-Carrier in die Zellen durch Peptidase-Aktivität die Aminosäuren Alanin und Lysin entstehen (Zittrich und Krämer, 1994). Nach unterschiedlichem hypoosmotischem Streß wurde der Gehalt von Alanin und Lysin im Zellüberstand mittels HPLC be-

stimmt. Ebenfalls untersucht wurde der Gehalt von Glutamat im Überstand, da diese Aminosäure in den glutamatproduzierenden Bakterienzellen ebenfalls akkumuliert wird. Der Nachweis von Glutamat erfolgte über einen enzymatischen Test (vergl. 2.4.3).

Das Ausmaß des Alanin-Efflux ist mit dem des Ectoin-Efflux vergleichbar. Nach starkem osmotischem Schock sind 53 % der ursprünglichen internen Menge ausgetreten. Dagegen werden Glutamat, das den größten Teil der internen Aminosäuren ausmacht, und Lysin signifikant zurückgehalten (s. Abb. 22). Im Fall von Lysin treten nach starkem osmotischem Streß lediglich 0,05 $\mu\text{mol}/\text{mg TM}$ aus, das entspricht 25 % des Initialgehalts. Der Efflux von Glutamat ist unter diesen Bedingungen mit 0,03 $\mu\text{mol}/\text{mg TM}$ (20 % des Anfangsgehaltes) sogar noch geringer. Eine osmotische Regulation des Lysin-Effluxes ist nicht zu erkennen,

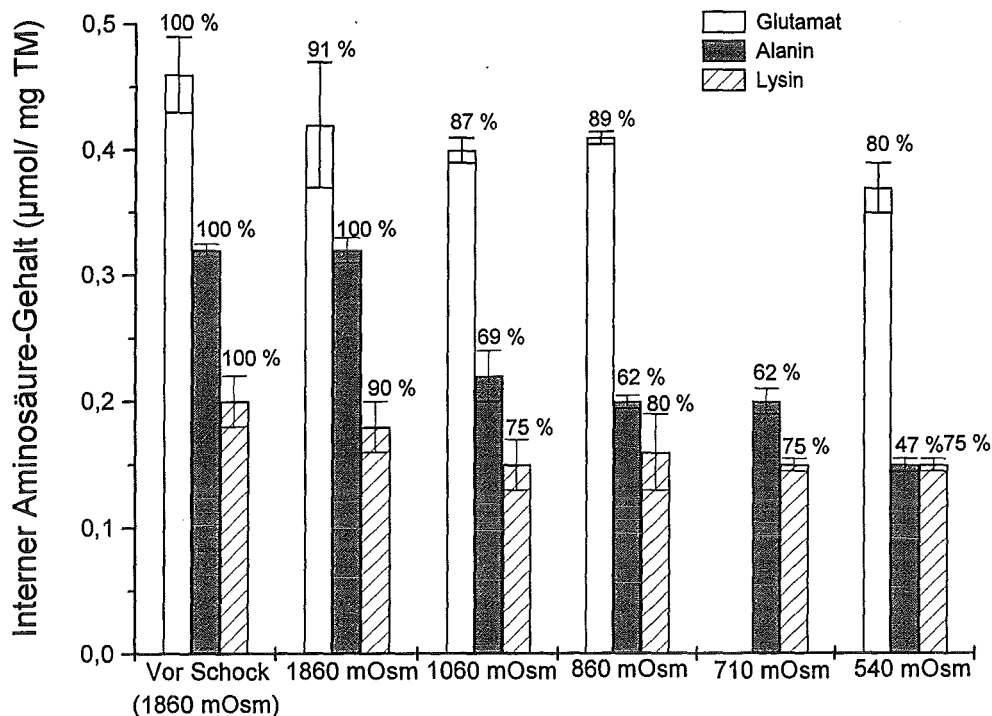


Abb. 22: Efflux von Alanin, Lysin und Glutamat nach hypoosmotischem Streß. Die Zellen wurden unter hyperosmotischen Bedingungen (1860 mOsm) in Anwesenheit von Glycinbetain mit dem Dipeptid L-Lysiny-L-Alanin beladen. 1 Minute nach osmotischem Schock wurde der Efflux der Aminosäuren aus den Pellets und Überständen bestimmt (2.4.3). Der Gesamtgehalt der Aminosäuren in den Zellen wurde nach Zell-Lyse mit 1 % CTAB ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen. Oberhalb der Balken ist der relative Aminosäuregehalt angegeben.

da bei geringem osmotischem Streß die gleiche Menge an Substanz austritt wie bei starkem osmotischem Streß. Schon bei isoosmolaler Resuspendierung ist ein Efflux von 10 % zu beobachten (Abb. 22). Der Export von Alanin nach hypoosmolaler Behandlung ist zwar deutlich stärker, als der der anderen Aminosäuren, eine lineare Korrelation zwischen interner Konzentration und externer Osmolalität, so wie sie bei den kompatiblen Solute beobachtet werden konnte (s. Kapitel 3.1.3.1), konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Der Beobachtung des eingeschränkten Efflux von Lysin und Glutamat nach hypoosmotischem Schock könnte entgegengehalten werden, daß die Aminosäuren sehr wohl ausgeschleust werden, jedoch dank der effektiven Aminosäure-Aufnahmesysteme von *C. glutamicum* genauso schnell wieder in die Zellen transportiert werden, so daß der Efflux in diesem Zeitfenster nicht beobachtet werden kann. Diese Interpretation kann im Fall von Lysin leicht widerlegt werden, da das Aufnahmesystem für diese Aminosäure in *C. glutamicum* sehr langsam arbeitet (Bröer und Krämer, 1990; Seep-Feldhaus *et al.*, 1991). Für Glutamat wurde die Möglichkeit der Wiederaufnahme untersucht, indem den Zellen während des osmotischen Stresses radioaktiv markiertes Glutamat zugegeben wurde. Es wurden nach den Verdünnungen lediglich vernachlässigbare Mengen der Markierung in den Zellen wiedergefunden, und zwar unabhängig davon, ob isoosmotisches oder hypoosmotisches Medium eingesetzt wurde (s. Tab. 3). Dies schließt die Möglichkeit aus, daß die Wiederaufnahme von Glutamat bei diesen Untersuchungen eine signifikante Rolle spielt.

Tab. 3: Wiederaufnahme von Glutamat. Zum Test auf Wiederaufnahme von Glutamat wurden die Zellen behandelt wie in Abb. 22 beschrieben. Zu den hypoosmotischen und isoosmotischen Verdünnungen wurden 200 μ M radioaktiv markiertes Glutamat gegeben. 1 Minute nach osmotischem Schock wurde der Gehalt an [^{14} C]-Glutamat, bezogen auf die eingesetzte spezifische Aktivität, in den Zellen und im Überstand mittels Szintillationszählung bestimmt.

Externe Osmolalität	Internes Glutamat	
	nM/ mg TM	%
1860 mOsm	2,0 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,2
540 mOsm	1,9 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,2

3.1.5.3 Efflux von Na^+ und K^+

Neben den organischen osmoprotektiven Substanzen spielen bei *E. coli* auch Kaliumionen eine Rolle bei der Osmoregulation (Berrier *et al.*, 1992, Schleyer *et al.*, 1993). Deshalb sollte die Effektivität des Na^+ - und K^+ -Efflux im Vergleich zu den organischen, ungeladenen Molekülen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die Ionenkonzentrationen in Anwesenheit von Glycinbetain nach hypoosmotischem Streß in den Überständen mittels Flammenphotometrie bestimmt. Anstelle von NaCl wurde Sorbitol als extern wirksames Osmolyt eingesetzt, da hohe externe Na^+ -Konzentrationen die Messungen verfälschen können.

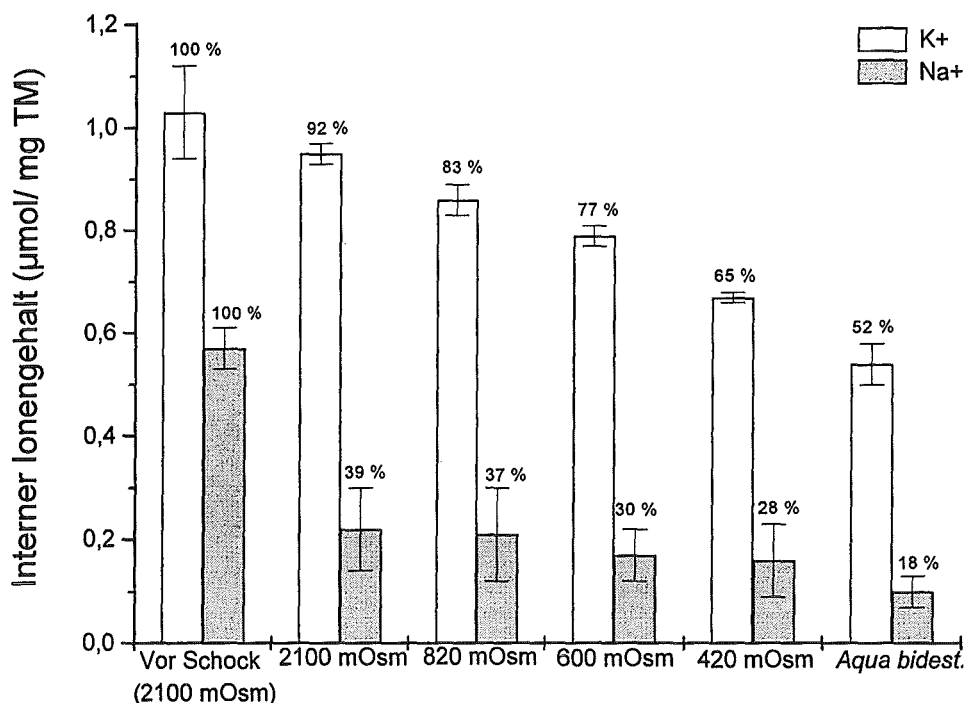


Abb. 23: Interner Na^+ - und K^+ -Gehalt nach hypoosmotischem Streß. Zur Bestimmung des Ionengehalts in den Bakterienzellen nach osmotischem Schock wurden diese zunächst 1 h unter hyperosmotischen Bedingungen in einem Na^+/K^+ -Puffer in Anwesenheit von 2 mM Glycinbetain inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal in isoosmolalem Sorbitolpuffer, der NaCl und KCl mit einer Konzentration von jeweils 5 mM enthielt, gewaschen. Der osmotische Schock erfolgte durch Wiederaufnahme der Zellen in Na^+/K^+ -freien Pufferlösungen unterschiedlicher Sorbitolkonzentrationen mit den angegebenen Osmolalitäten. Nach 1 minütiger Inkubation der Zellen in diesen Puffern wurden sie filtriert und der Ionengehalt im Filtrat und in den Überständen bestimmt. Zur Messung des Ionen-Gesamtgehalts wurde ein Teil der Zellen mit 1 % CTAB behandelt (= 100 %). Der Versuch wurde bei 30 °C durchgeführt.

Unter hyperosmotischem Streß akkumulieren die Zellen erhöhte Na^+ - und K^+ -Konzentrationen. Zu Beginn des Versuchs befinden sich $1,03 \mu\text{mol}/\text{mg TM K}^+$ und $0,57 \mu\text{mol}/\text{mg TM Na}^+$ in den Zellen. Im Vergleich dazu enthalten die Zellen, wenn hyperosmotisch streßfrei angezogen, lediglich $0,34 \mu\text{mol}/\text{mg TM K}^+$ und $0,1 \mu\text{mol}/\text{mg TM Na}^+$.

Abgesehen von einem anfänglichen signifikanten Na^+ -Verlust unter isoosmolalen Bedingungen, der auf die drastische Änderung des chemischen Potentials nach Entfernen der externen Ionen zurückzuführen ist, war die Effluxrate von Na^+ nach hypoosmotischem Schock unter diesem Gesichtspunkt vernachlässigbar gering (vergl. Abb. 23). Auch der Efflux von K^+ verläuft in deutlich geringerem Ausmaß, als der der kompatiblen Solute. Nach Senkung der externen Osmolalität von 1860 mOsm auf 540 mOsm traten $0,36 \mu\text{mol}/\text{mg TM K}^+$ -Ionen aus, das entspricht 35 % der anfänglichen Konzentration (s. Abb. 23). Da auch nach Resuspension in reinem Wasser ein relativ hoher Ionen-Anteil in den Zellen verblieb (Abb. 23), wurden die Effluxversuche zur Kontrolle bei 0°C durchgeführt. Dieser sogenannte *coldshock* führt gewöhnlich zu einer annähernd vollständigen Entleerung der Zellen (Berrier *et al.*, 1992). Also sollte unter Annahme korrekter experimenteller Bedingungen auch ein gesteigerter Ionen-Efflux erfolgen. Tatsächlich treten nach hypoosmotischem Schock bei dieser Temperatur beide Ionentypen verstärkt aus (Abb. 24). Na^+ verbleibt bei starkem hypoosmotischem Schock nur noch zu 15 %, K^+ zu 47 % in den Zellen. Wurden die Zellen in destilliertem Wasser resuspendiert, senkte sich der interne Na^+ -Gehalt sogar auf 3 %, der K^+ -Gehalt auf 35 % (vergl. Abb. 24). Eine Überprüfung zur Wiederaufnahme der Ionen nach Schock, wie sie für Glutamat durchgeführt wurde, war in diesem Fall experimentell nicht möglich. Allerdings war die Aufnahme von Na^+ und K^+ in *C. glutamicum* bereits zu einem früheren Zeitpunkt gemessen und dabei Raten von bis zu $100 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g TM}^{-1}$ festgestellt worden (Krämer *et al.*, 1990). Basierend auf diesen Werten kann eine interne Konzentrationsänderung von 100 mM innerhalb von 2 min berechnet werden. Also hätte eine Wiederaufnahme unter den experimentellen Bedingungen auf jeden Fall beobachtet werden können, wenn sie erfolgt wäre.

Bei *E. coli* wurde beobachtet, daß nach starkem hypoosmotischem Schock sogar das große und für die Zellen wichtige Molekül ATP austritt (Berrier *et al.*, 1989). ATP-Messungen nach hypoosmotischem Streß bei *C. glutamicum* kamen zu einem anderen Ergebnis: Selbst nach starkem Schock konnte kein Austritt dieser Substanz beobachtet werden (s. Tab. 4). Aus diesem von den Ergebnissen bei *E. coli* abweichenden Befund geht eindeutig hervor, daß der Export der Substanzen nicht durch eine undichte Membran erfolgt. Eine intakte Membran ist allerdings auch für *E. coli* nachgewiesen, da der Efflux von ATP durch Zugabe von Gd^{3+} inhibierbar ist (Berrier *et al.*, 1992).

Unter bestimmten Bedingungen akkumulieren *C. glutamicum* Trehalose als osmoprotektive

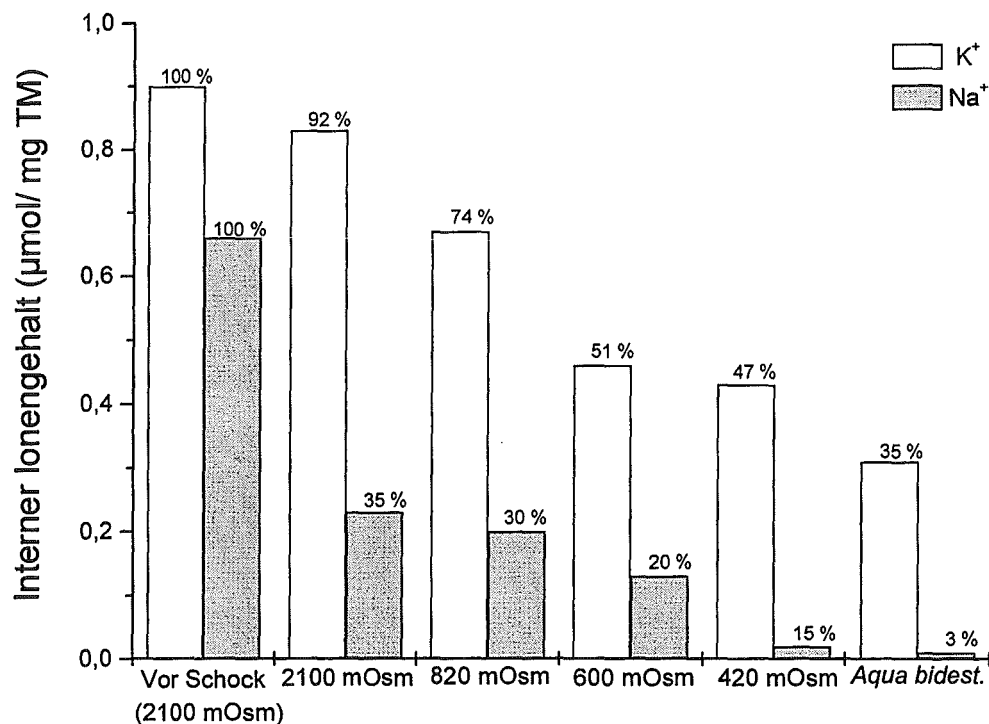


Abb. 24: Na⁺- und K⁺-Gehalt der Zellen nach coldshock. Mit Ausnahme der Versuchstemperatur von 0 °C wurden die Zellen so behandelt wie unter Abb. 23 beschrieben.

Substanz (Guillouet und Engasser, 1995 a). Unter den in dieser Arbeit angewendeten Anzuchtbedingungen und Behandlungen der Zellen konnte kein Anstieg der internen Trehalose-Konzentration beobachtet werden. Da die Trehalose-Konzentration in den Zellen niemals über 10-15 mM hinausging, konnte kein sicherer Nachweis erfolgen, in wieweit diese Substanz als Substrat der Efflux-Kanäle angenommen wird.

Um die Ergebnisse zusammenzufassen, ist der osmotisch regulierte Efflux der untersuchten Substanzen in der Tabelle 4 zusammengestellt. Bei *C. glutamicum* bleibt der osmotisch induzierte Efflux auf die kompatiblen Solute Glycinbetain und Prolin beschränkt (Tab. 4). Die anderen untersuchten Substanzen konnten den Kanal offensichtlich nicht in gleichem Ausmaß nutzen, selbst die kleineren Ionen wurden unter gleichen Bedingungen stärker zurückgehalten. Solange die molekulare Struktur des Kanals nicht aufgeklärt ist, läßt sich eine Beteiligung mehrerer Kanäle unterschiedlicher Eigenschaften am Efflux nicht ausschließen. Der langsame bzw. geringere Efflux der untersuchten Substanzen zeigt aber, daß diese Moleküle keine Substrate der osmotisch regulierten Kanäle in *C. glutamicum* sind.

Tab.4: Spezifität des hypoosmotisch induzierten Efflux in *C. glutamicum*. Die Zellen wurden unter hyperosmotischen Bedingungen beladen wie in den Kapiteln 2.4.2-2.4.7 beschrieben. Der osmotische Schock erfolgte wie in der Tabelle angegeben. 1 Minute danach wurde der Gehalt der Solute in den Zellen und im Medium mittels Szintillationszähler (Sz.zähler), HPLC, NMR, Flammenphotometrie (Flammenph.), Luziferin/Luziferase-Assay, oder enzymatisch (enzym.) bestimmt. Die Werte sind in $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g TM}^{-1}$ angegeben. Für die isoosmolare Kontrolle sowie den starken hypoosmotischen Schock von 540 mOsm sind ebenfalls die relativen Werte angegeben.

Analytische Methode		Interner Solutgehalt ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg TM}^{-1}$)						
		Vor Schock	Nach hypoosmotischer Resuspension					
		Osmolalität:	1860 (100%)	1860 (%)	1060	860	710	540 (%)
Glycinbetain	Sz.zähler		0.92	0.90 (98)	0.68	0.56	0.43	0.28 (30)
Prolin	Sz.zähler		0.94	0.91 (97)	0.63	0.50	0.38	0.27 (29)
Ectoine	NMR		0.52	0.51 (98)	0.50	0.46	0.44	0.29 (56)
Glycinbetain ¹	NMR		0.35	-	-	0.15	0.11	0.01 (3)
+ Ectoin ¹	NMR		0.45	-	-	0.34	0.32	0.23 (51)
Alanin ⁴	HPLC		0.32	0.32 (100)	0.22	0.20	0.20	0.15 (47)
Glutamat ⁴	enzym.		0.46	0.42 (91)	0.40	0.41	-	0.37 (80)
Lysin ⁴	HPLC		0.20	0.18 (90)	0.15	0.16	0.15	0.15 (75)
ATP ²	Luciferase		0.007	0.007(100)	0.007	0.007	0.007	0.007 (99)
Na ⁺ 3,4	Flammenph.		0.57	0.22 (39)	-	0.21	0.17	0.16 (28)
K ⁺ 3,4	Flammenph.		1.03	0.95 (92)	-	0.86	0.79	0.67 (65)

¹ Die Beladung erfolgte gleichzeitig mit Glycinbetain (3 mM) und Ectoin (3 mM).

² Der Efflux von ATP ging in keinem Fall über 2% des gesamten ATP-Gehalts im Cytoplasma hinaus.

³ Im Fall von Na⁺ und K⁺ wurde die externe Osmolalität folgendermaßen abgestuft: 2100/1140/820/600/420 mOsm.

⁴ Die Beladung erfolgte in Anwesenheit von Glycinbetain, um eine kompetitive Situation zu erhalten (s. Text).

3.1.6 Die Wirkung von Gadolinium

Das Lanthanoid Gadolinium (Gd^{3+}) ist als dreiwertiges Kation ein bekannter Inhibitor mechanosensitiver Kanäle (Hamill und McBride, 1996). In *E. coli* konnten sowohl der osmotisch induzierte Efflux *in vivo*, als auch die mechanosensitiven Kanäle im *patch-clamp*-Experiment mit Gd^{3+} inhibiert werden (Berrier *et al.*, 1992).

Zunächst sollte untersucht werden, ob der hypoosmotisch induzierte Efflux in *C. glutamicum* ebenfalls durch das Lanthanoid inhibiert werden kann. Zu diesem Zweck wurden die Zellen unter hyperosmotischen Bedingungen mit Glycinbetain beladen, in niederosmolalem Puffer in Anwesenheit des Inhibitors resuspendiert und anschließend der Efflux des kompatiblen Solut bestimmt. In Abb. 25 sind die internen Glycinbetain-Konzentrationen vor und nach osmotischem Schock sowie in Anwesenheit von Gd^{3+} und ohne Gd^{3+} dargestellt.

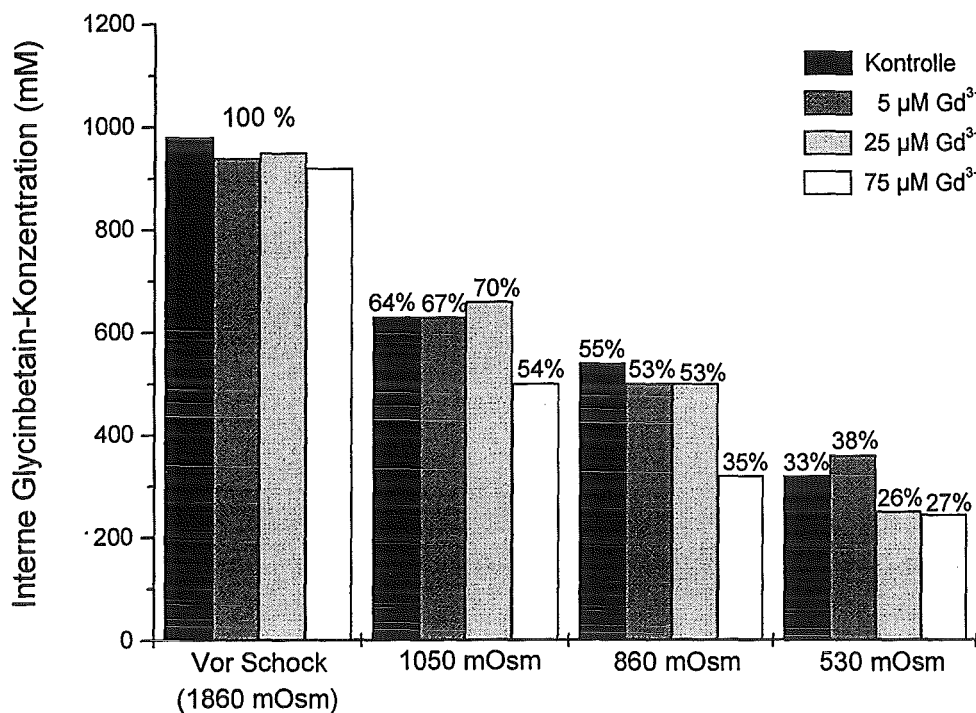


Abb. 25: Efflux von Glycinbetain in Gegenwart des Inhibitors Gd^{3+} . Die Zellen wurden unter hyperosmotischen Bedingungen mit Glycinbetain beladen. Anschließend erfolgte eine Resuspendierung der Zellen in Pufferlösungen mit den angegebenen Osmolalitäten, die entweder kein Gd^{3+} enthielten (Kontrolle), oder mit 5 μM , 25 μM oder 75 μM Gd^{3+} versetzt waren.

Wird der Inhibitor in geringeren Konzentrationen zugesetzt (5 μM ; 25 μM), läßt sich kein signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten und behandelten Zellen feststellen. Bei der Gd^{3+} -Konzentration von 75 μM ist sogar ein verstärkter Efflux zu beobachten. Um dem Kation einen besseren Zugang zur Cytoplasmamembran zu ermöglichen, der bei den Gram-positiven Bakterien durch die starke Zellwand limitierend sein könnte, wurden Effluxmessungen mit Zellen vorgenommen, die durch entsprechende Vorbehandlung teilweise permeabilisiert waren (vergl. 2.4.2.3). Wie aus Tabelle 5 hervorgeht, wird der Efflux in Anwesenheit des Inhibitors auch bei den permeabilisierten Zellen leicht verstärkt. Während bei den Kontrollzellen 33 % bzw. 34 % des vorher akkumulierten Glycinbetains in den Zellen verbleibt, sind es in Anwesenheit von Gd^{3+} nur noch 22 % bzw. 29 %. Eine Erhöhung der Gd^{3+} -Konzentration auf 250 μM führte ebenfalls nicht zur Hemmung des Efflux (Tab. 5).

In den Patch-Clamp-Versuchen (s. 3.4) wurde beobachtet, daß die Zugabe des Inhibitors zunächst zu einer kurzen Aktivitätssteigerung der mechanosensitiven Kanäle führte, bevor die Hemmung einsetzte. Dies könnte eine Erklärung sein, warum das Lanthanoid auch bei den permeabilisierten Zellen keine Inhibierung zeigte. Im Effluxversuch würde diese Reaktion zunächst zu einem erhöhten Glycinbetainausfluß führen. Deshalb wurde der Versuch unternommen, den Inhibitor schon vor dem osmotischen Schock zu applizieren. Damit wären die Kanäle beim Einsetzen des osmotischen Schocks inhibiert, das mit der anfänglichen Aktivitätssteigerung ausgeschleuste Glycinbetain bereits wieder aufgenommen. Die Zellen wurden nach der Beladung mit Glycinbetain aliquotiert und auf Eis gestellt, wo einem Teil der Ansätze 250 μM Gd^{3+} zugegeben wurde. Danach wurden die Zellen 3 Minuten bei 30 °C adaptiert, zentrifugiert und hypoosmotisch gestreßt. Diese Behandlung führte bei den Zellen allerdings schon vor dem osmotischen Schock zu großen Schäden. Sie befanden sich nicht mehr in Lösung, sondern waren sedimentiert und im Gegensatz zu den Kontrollzellen flockiger und von hellerer Farbe. Daraufhin wurde die Gd^{3+} im nächsten Versuch auf 75 μM bzw. 25 μM reduziert. Bei diesen Inhibitor-Konzentrationen unterschieden sich die damit behandelten Zellen optisch nicht von den Kontrollzellen. Als Folge der ersten Aktivierung der Kanäle enthielten die Zellen zu Beginn des Versuchs nur noch ungefähr halb soviel Glycinbetain wie die Kontrollzellen. Im anschließend erfolgenden osmotischen Schock führten diese Inhibitor-Konzentrationen, genauso wie bei zeitgleicher Zugabe von Gd^{3+} nicht zu einer Hemmung, sondern eher zu einer Verstärkung des Effluxes (Tab.5).

Tab. 5: Osmotisch aktivierter Efflux von Glycinbetain in Anwesenheit von Gd^{3+} . Die Zellen wurden angezogen wie unter 2.4.2 bzw. 2.4.3 beschrieben. Die Zugabe des Lanthanoids erfolgte entweder zeitgleich mit dem hypoosmotischen Schock ($t = 0$ min) oder 3 Minuten vorher ($t = -3$ min). Angegeben ist der Gehalt von Glycinbetain in den Zellen 1 Minute nach Ausführung des hypoosmotischen Stresses relativ zu ihrem Ausgangsgehalt.

Zeitpunkt der Gd^{3+} -Zugabe	Gd^{3+} (μM)	Unbehandelte Zellen		Permeabilisierte Zellen	
		1900 mOsm %	540 mOsm %	1900 mOsm %	540 mOsm %
$t = 0$ min	-	96	33	97	34
	75	87	22	98	29
	250	83	12	76	35
$t = -3$ min	25	94	6	87	13
	75	88	7	94	7

3.2 Energetische Konsequenzen des Osmolyt-Effluxes für die Zellen

Bislang wurde der Solut-Efflux bei einzelnen, schrittweise erfolgenden Änderungen der externen Osmolalität untersucht und eine linear korrelierte Reaktion der Zellen zum angelegten hypoosmotischen Schock beobachtet. Es stellte sich die Frage, wie sich die osmotisch regulierten Kanäle bei einer kontinuierlichen Senkung der externen Osmolalität verhalten würden. Würde die Reaktion schrittweise stattfinden, oder kontinuierlich über den gesamten Bereich der angelegten osmotischen Veränderung?

Um dies zu überprüfen, wurden die Zellen in hyperosmolalem Puffer (1450 mOsm) in einem offenen Becherglas unter Rühren inkubiert, dem kontinuierlich ein definiertes Volumen an Wasser zugefügt, und diskontinuierlich das gleiche Volumen pro Minute entnommen wurde (s. auch 2.4.2). Diese Versuchsdurchführung erlaubte sowohl die genaue Bestimmung der aktuellen Osmolalität des Mediums, als auch die Messung der externen und internen Markierung. Zur Kontrolle wurde isoosmolaler Puffer zugegeben. In Abb. 26 ist die Osmolalität des Mediums und die Glycinbetain-Konzentration in den Zellen unter Kontrollbedingungen sowie bei hypoosmotischer Verdünnung angegeben. Während der Glycinbetain-Gehalt in den Zellen unter isoosmotischen Bedingungen konstant bleibt, nimmt er mit sinkender Osmolalität kontinuierlich ab. Es ist keine Abstufung zu erkennen, d.h., daß die Bakterien anscheinend

auf die kontinuierliche Änderung der externen Osmolalität mit einem kontinuierlichen Glycinbetain-Verlust reagieren.

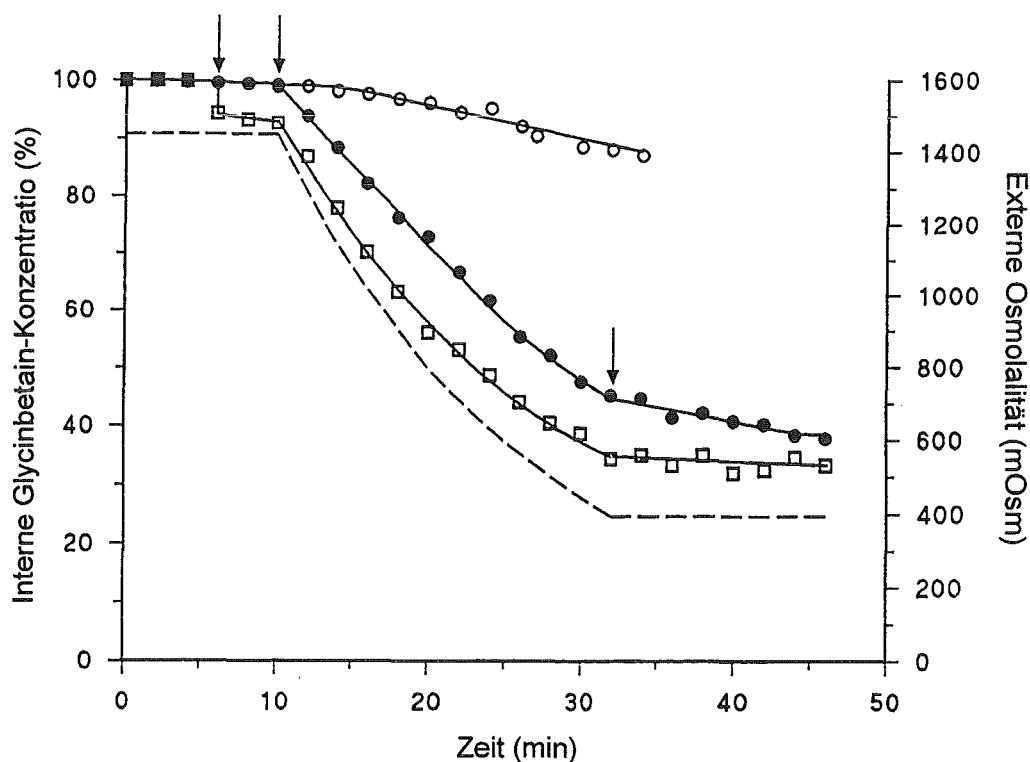


Abb. 26: Kontinuierlicher Efflux von Glycinbetain. Die Zellen wurden in hyperosmotischem Puffer (1450 mOsm) mit Glycinbetain beladen, gewaschen und unter Rühren in einem Becherglas inkubiert. Der Efflux wurde wie in 2.4.2 beschrieben ausgelöst und analysiert. Zunächst wurde isoosmolaler Puffer (1450 mOsm) zugegeben. Nach 10 min (2. Pfeil) wurde die einfließende Lösung gegen *Aqua bidest.* ausgetauscht, welches nach 31,5 min wieder gegen isoosmolalen Puffer (400 mOsm) getauscht wurde (3. Pfeil). Während des Experiments wurde die aktuelle externe Osmolalität (gestrichelte Linie) sowie der cytoplasmatische Gehalt an Glycinbetain in Abwesenheit (●) und Anwesenheit (□) von 40 μ M CCCP bestimmt. CCCP wurde 5 min nach Beginn des Experimentes zugegeben. In einem Kontrollversuch wurde ausschließlich isoosmolaler Puffer zugegeben (O). Die absoluten internen Glycinbetain-Konzentrationen waren 750 mM (●), 760 mM (□), und 690 mM (O).

Um eine eventuelle Beteiligung von BetP, dem Glycinbetain-Aufnahmesystem in *C. glutamicum*, zu untersuchen, wurde der Versuch in Anwesenheit von 40 μM CCCP wiederholt (Abb. 26). Der Entkoppler beseitigt das Membranpotential, die treibende Kraft des sekundären Aufnahmesystems. Wenn die Umkehrung der BetP-Aktivität für den Efflux von Glycinbetain verantwortlich wäre, würde man unter diesen Bedingungen einen drastischen Anstieg des Glycinbetain-Ausflusses erwarten. Dies trat aber nicht ein. Man beobachtete lediglich direkt nach Zugabe des Entkopplers eine Senkung der internen Glycinbetain-Konzentration noch unter isoosmotischen Bedingungen. Abgesehen von dieser konstant niedrigeren internen Glycinbetain-Konzentration verlief der Efflux genauso wie in Abwesenheit von CCCP.

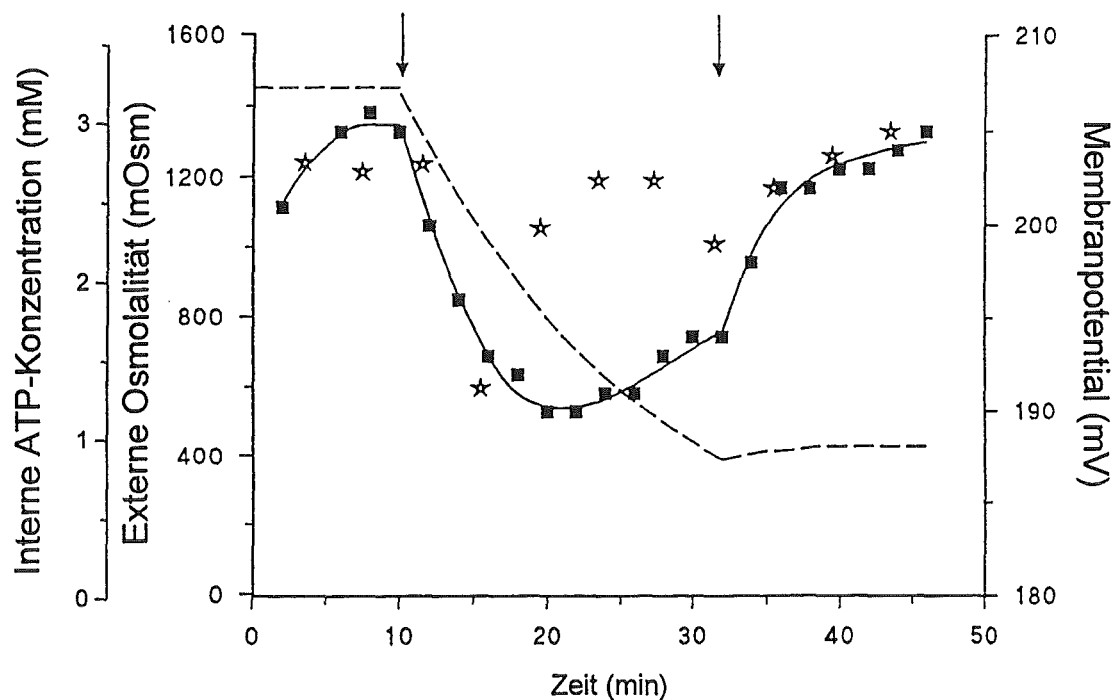


Abb. 27: Energetische Situation der Zellen während des kontinuierlichen Efflux von Glycinbetain. Die Versuchsbedingungen waren mit denen in Abb. 26 identisch, außer daß die Zellen mit unmarkiertem Glycinbetain beladen wurden. Zur Bestimmung des Membranpotentials wurde zu Beginn des Experiments 0,5 μM [^{14}C]-Tetraphenylphosphoniumbromid zugegeben. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt. Das Membranpotential wurde dabei um 13 mV, 15 mV bzw. 16 mV gesenkt. Die Sterne geben die jeweilige ATP-Konzentration in den Zellen an.

Dieser kontinuierliche Efflux kann nicht erfolgen, ohne Auswirkungen auf die energetische Situation der Zellen zu haben. Um diese zu untersuchen, wurde das Membranpotential der Zellen während des kontinuierlichen Effluxes bestimmt (Abb. 27). Mit Einsetzen der Verdünnung nahm das Membranpotential der Zellen ab und blieb auf diesem niedrigen Niveau, solange die Kanäle geöffnet waren, d.h. solange der Efflux von Glycinbetain anhielt. Nachdem wieder isoosmolaler Puffer zugegeben worden war, erholte sich das Membranpotential und erreichte die für voll energetisierte Zellen dieser Bakterien typischen Werte (Krämer *et al.*, 1990). Das Membranpotential wurde nicht für unspezifische Bindungen korrigiert, da lediglich die Potentialdifferenz beider Zustände von Interesse war (Zaritsky *et al.*, 1981).

Da das Membranpotential auch direkt durch die Öffnung der Kanäle und einen damit einhergehenden Ladungsverlust beeinträchtigt sein könnte, wurde als unabhängiges Maß für den energetischen Zustand der Zellen ihr ATP-Gehalt bestimmt (Abb. 27). Zu Beginn des Glycinbetain-Effluxes ist eine vorübergehende Senkung des intrazellulären ATP-Gehalts zu beobachten. Dieser erholt sich jedoch viel schneller, als das Membranpotential, und erreicht noch in der letzten Phase des Efflux ein normales physiologisches Niveau.

3.3 Versuche zur Isolierung des Gens für den großen mechanosensitiven Kanal MscL

Das bislang einzige identifizierte Gen für einen mechanosensitiven Kanal ist das Gen für den großen mechanosensitiven Kanal in *E. coli*, *mscL* (Sukharev *et al.*, 1994). Bei einigen anderen Bakterienstämmen konnten Sequenzen mit hoher Ähnlichkeit zu dem Gen von *E. coli* gefunden werden, die für Proteine mit gleicher Funktion codierten (Moe *et al.*, 1998). Die elektrophysiologischen Untersuchungen bei *C. glutamicum* haben weder Klarheit darüber erbracht, wieviele einzelne Proteine für die beobachteten Kanalöffnungen verantwortlich sind, noch, ob *C. glutamicum* ebenfalls einen Kanal des Typs MscL besitzt (s. Kap. 3.4). Molekularbiologische Untersuchungen könnten darüber Aufschluß geben und damit Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen und Erkenntnisse über die molekularen Hintergründe des hypoosmotisch regulierten Efflux werden. Deshalb sollte versucht werden, dieses Gen mittels PCR oder Southern-Blot-Analyse aus dem Genom von *C. glutamicum* zu isolieren.

Um *primer* für die PCR zu konstruieren, wurden die zugehörigen Proteinsequenzen der von Moe *et al.* (1998) untersuchten Gene mit der kürzlich sequenzierten DNA von *M. tuberculosis* verglichen. In Abb. 28 ist das *alignment* der Proteinsequenzen der verschiedenen Organismen dargestellt. Die Kanäle der Gram-negativen Bakterien zeigen eine relativ hohe Ähnlichkeit über den gesamten Bereich. Auch im Vergleich mit den Gram-positiven Organismen und *Synechocystis* zeigt sich, daß die mechanosensitiven Kanäle vor

```

E.coli      M.....SIIKEFREFAMRGNVVDLAVGVIIIGAAFGKIVSSSLVADIIMPPGLLIGGIDFKQFAVTLRDAQGD.....IPAVVMH
E.carotovora M.....SIIKEFREFAMRGNVVDLAVGVIIIGALFGKIVSSSLVSDIIMPPGLLIGGVDFKQFALFLRNAQGG.....IPAVVMN
P.fluorescens M.....GLLSEFKAFVKGNNVDMAGVIGIIGAAFGKIVSSSFVGDVIMPPIGLLIGGVDFSDLAITIK.AEGD.....VPAVLA
H.influenza M.....NFIKEFREFAMRGNVVDMAVGVIIGSAFGKIVSSSLVSDIFTFVLGILTGGIDFKDMKFVLAQAQGD.....VPAVTLN
M.tuberculosis M.....LKGFKEFLARGNIVDLAVAVVIGTAFTALVTKFTDSII TPLINRI.GVNAQSDVGILRIGIG.....GGQTID
B.subtilis M.....WNEFKAFAMRGNIVDLAIGVVIGGAFGKIVTSLVNDIIMPLVGLLGGGLDFSGLSFTF.....GDAVVK
C.perfringens M.....WKEFKEFAMKGNVIDLAIGVVIGGAFGKIVTSLVNDIIMPVVGSIVGVKVDENLYINLSGQQFNSLQEAQAAGAATIN
S.aureus M.....LKEFKEFALKGNVLDLAIIVVMGAAFNKIISSLVENIIMPLIGKIFGSVDEAKESFWG.....IK
Synechocystis sp MVKSARQGAG.GFWRDFKDFILRGNVVDLAVAVVIGGAFTSIVNAFVAVLMAVLLQPVLDQAGVSQQLQDL.....PLG
Primer 5':      ---1.---      ---3.---      ---5.---
                  ---2.---      ---4.---

```

```

E.coli      YGVFIQNVFDELTIVAFAT.FMAIKLINKINR.KKEE.PAAAPAPTKEEVLLTEIRDILKEQNNRS
E.carotovora YGAFIQNIEDEIIVAFAT.FIATIKLMNMRC.KQEDTPAAPPKPSAEEKLLAEIRDILKEQQTRQ
P.fluorescens YRKEFIQTVLNEVIVAFAT.FMGVKAINREKR.EEAVAPSEPPVPSAEETILTETIRDILKAQQNKS
H.influenza YGLEFIQNVIDEIIVAFAT.FMMIKVINKVRK.....PEEKKTAPKAETILTETIRDILKKNK
M.tuberculosis LNVLLSAAINEFLIAFVAVYFLVLPYNTLIRKKGEVEQPG....DTQVVLLTEIRDILAAQTNGDSPGRHGGRGTPSPTDGPRASTESQ
B.subtilis YGSEFIQTIVNELIISFST.FIVIRTNLGLRRKKEAEAEAEAEAVDAQEELLKEIRDILKQQAQKSPE
C.perfringens YGLEFLNNLINEFLIAFST.FIVIKQINKLKNFTKKKEEVKVEATEKDCPYCYTKIDIKATRCPHCTSVLEEATN
S.aureus YGLEFIQSVIDEIIVAFAT.FIFVKIANTILMKKEAEAEAE...VVEENVVLLTEIRDILREKK
Synechocystis sp LGELVIAIINELIIVAFVIFLIKAIEKMORKKAVEEEI...VAEAQDPVLEAQTNLTDTSINRLITTLNQSSSQ
Primer 3':      ---1.---      ---3.---      ---5.---
                  ---2.---      ---4.---

```

Abb. 28: Die MscL-Kanäle weisen einen hohen Grad an Sequenzkonservierung auf. Das Alignment der MscL-Homologen der unterschiedlichen Organismen zeigt stark konservierte Regionen im N-terminalen Bereich und weniger konservierte Regionen im C-terminalen Bereich. Zu den markierten Bereichen wurden vollständig degenerierte *Primer* sowie *Primer* unter Berücksichtigung der *Codon Usage* von *C. glutamicum* synthetisiert. Bei einem dritten Ansatz wurde bei der Synthese der Oligonukleotide vorwiegend der Sequenzverlauf im Gen des zu *C. glutamicum* verwandten Organismus *M. tuberculosis* berücksichtigt.

allen im C-terminalen Bereich einen hohen Grad an Sequenzkonservierung aufweisen. Es wurden, wie angegeben, 5 degenerierte *primer* passend zum C-terminalen Bereich und 5 degenerierte *primer* passend zum schlechter konservierten N-terminalen Bereich synthetisiert (Abb. 28). Die *primer* waren entweder vollständig degeneriert, oder, unter Berücksichtigung der *codon usage* von *C. glutamicum* teilweise degeneriert. Es wurden ebenfalls *primer* konstruiert, deren Sequenz sich an der des *M. tuberculosis*-Proteins orientierte, da dieses Bakterium mit *C. glutamicum* eng verwandt ist. Der 4. *primer* des 3'-Bereichs wurde passend zu einer Region synthetisiert, die sich bei Versuchen mit *E. coli*-Mutanten als essentiell für die Kanalfunktion erwiesen hatte (Häse *et al.*, 1997). Alle *primer* wurden miteinander kombiniert in die PCR-Reaktionen eingesetzt, die unter Variation der MgCl₂-Konzentration, der *annealing*-Temperatur, der *primer*- sowie der DNA-Konzentration durchgeführt wurden.

Während bei den Kontroll-PCR-Reaktionen mit homologen Oligonukleotiden, die gegen die Gene von *E. coli*, *B. subtilis* und *M. tuberculosis* gerichtet waren, einzelne DNA-Fragmente der erwarteten Größe erhalten wurden, traten mit den degenerierten Oligonukleotiden bei *C. glutamicum* bis auf eine Ausnahme mehrere PCR-Fragmente unterschiedlicher Größe auf. Die Sequenzanalyse der jeweiligen Produkte ergab, daß bei den Kontrollen tatsächlich die gesuchten Gene für den großen mechanosensitiven Kanal amplifiziert werden konnten. Die untersuchten PCR-Fragmente aus *C. glutamicum*-DNA wiesen allerdings keine bzw. eine geringfügige Ähnlichkeit mit dem *mscL* auf. Die hochkonservierten Gensequenzen, die sonst in den Genen aller Organismen enthalten waren, konnten allerdings nicht wiedergefunden werden.

Mittels PCR wurden die DNA-Fragmente der *mscL*-Gene aus *E. coli*, *B. subtilis* und *M. tuberculosis* DIG-markiert und als Sonden in einer Southern-Blot-Analyse verwendet (s. 2.8.7). Auch mit Hilfe dieser Methode konnte keine dem *mscL* ähnliche Sequenz in *C. glutamicum* isoliert werden. Entweder führte die Hybridisierungsreaktion zu einer Vielzahl an Signalen, was eine weiterführende Analyse verhinderte, oder die Bedingungen waren so stringent gewählt, daß gar kein Signal mehr zu erkennen war. Das Gen für den MscL in *C. glutamicum* konnte also nicht identifiziert werden.

3.4 Elektrophysiologische Untersuchung mechanosensitiver Kanäle in *C. glutamicum*

Mechanosensitive Kanäle werden durch mechanische Kräfte auf die Membran aktiviert bzw. inaktiviert. In Bakterien werden sie mit der Regulation hypoosmotischer Veränderungen in Verbindung gebracht, da bei Turgoränderungen, wie sie bei osmotischem Streß vorkommen, eine erhöhte Membranspannung auftritt (Zoratti und Petronilli, 1988; Berrier *et al.*, 1992; Cui *et al.*, 1995). In den vorhergehenden Kapiteln wurde gezeigt, daß auch bei *C. glutamicum* der hypoosmotisch induzierte Efflux durch mechanosensitive Kanäle vermittelt wird. Um

diese Kanäle genauer zu charakterisieren, wurden elektrophysiologische Messungen an Membranfragmenten von *C. glutamicum* vorgenommen.

3.4.1 Isolierung und Charakterisierung von Membranfragmenten aus *C. glutamicum*

Voraussetzung für den experimentellen Zugang zu den Kanälen der Plasmamembran ist die Entfernung der Zellwand, da die Zellwand von *C. glutamicum*, wie auch die einiger anderer Gram-positiver Organismen, porenbildende Aktivität besitzt (Niederweis *et al.*, 1995). Waren die Zellwandfragmente nicht vollständig von der Cytoplasmamembran getrennt und immer noch in den Proteoliposomen vorhanden, konnten damit in den elektrophysiologischen Experimenten keine dichten und stabilen *seals* gebildet werden. Zur vollständigen Trennung von Zellwand und Plasmamembran wurde der Rohextrakt der Membranfragmente gemäß Niederweis *et al.* (1995) auf einem Saccharose-Gradienten aufgetrennt (Abb. 29). Als Markenzym für die Cytoplasmamembran wurde die NADH-Oxidase-Aktivität der einzelnen Fraktionen ermittelt und auf den jeweiligen Proteingehalt bezogen. Die Fraktion 2 zeigte die

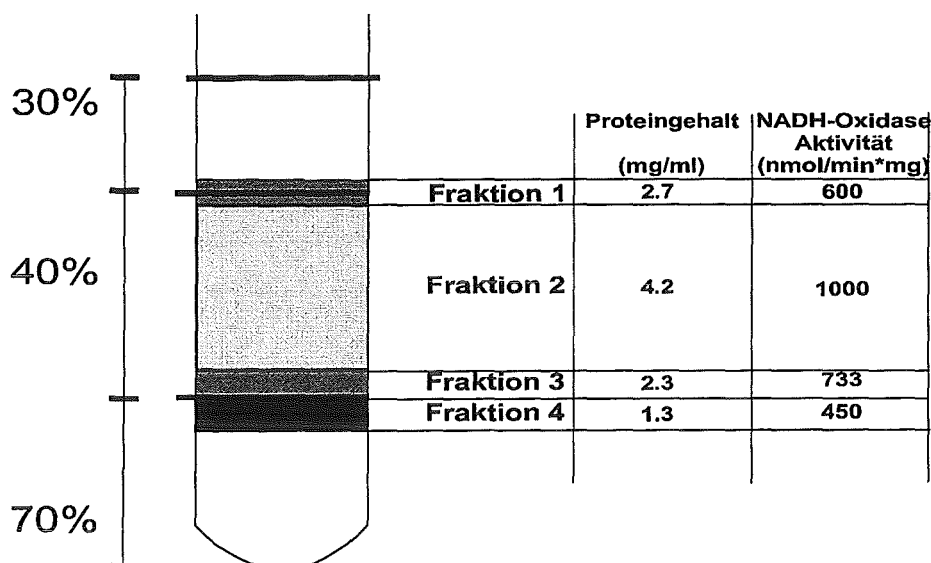


Abb. 29: Auftrennung der Membranpräparation von *C. glutamicum*. Die cytoplasmatische Membran, aufgearbeitet wie unter 2.7.1 beschrieben, wurde auf einen Saccharose-Gradienten aufgegeben (Niederweis *et al.*, 1995). Vier Fraktionen, die aufgrund ihrer Farbe deutlich unterschieden werden konnten, wurden, wie auf der rechten Seite angedeutet, gesammelt. Der Proteingehalt sowie die NADH-Oxidase-Aktivität der Fraktionen wurde bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle angegeben.

höchste spezifische Aktivität. Diese Membranfraktion wurde mit einer Konzentration von 1 µg Protein/ µl zur Herstellung von *giant proteoliposomes* eingesetzt. Die Fusion von Membranfragmenten und Liposomen wurde durch einen Dehydratations- Rehydratationszyklus erzeugt, wobei das Verhältnis von Proteinen und Lipiden 1:20 betrug. Die Qualität der so erzeugten Proteoliposomen, d.h. die Stabilität der mit ihnen gebildeten *seals* war sehr stark davon abhängig, wie die Membranpräparation durchgeführt wurde, bevor sie auf den Saccharosegradienten aufgetragen wurde. Optimale Membranfraktionen wurden nach moderater *French@ press* – Behandlung der Zellen erhalten (vergl. 2.7.1). Die Zugabe von Zellwand-verdauenden Enzymen vor dem Zellaufschluß führte zu einer signifikanten Abnahme des zur Bildung der Proteoliposomen geeigneten Membranertrags. Aus diesem Material konnten keine festen, stabilen *seals* gebildet werden, d.h. es war anzunehmen, daß die Membranfragmente immer noch Porine enthielten. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß bei der Enzymbehandlung sehr kleine Zellwandbruchstücke entstehen, die schlechter von der Membran zu trennen sind als große Bestandteile.

3.4.2 Identifizierung der mechanosensitiven Kanäle der Cytoplasmamembran von *C. glutamicum*

Zur Untersuchung der mechanosensitiven Kanäle der Cytoplasmamembran in *C. glutamicum* wurden in symmetrischem 100 mM KCl-Puffer *high-resistance seals* an Proteoliposomen angelegt (s. 2.7.5). Diese wurden entweder in der *cell-attached*-Konfiguration belassen oder in die *excised patch*-Konfiguration überführt. In jedem so angelegten *patch* konnte Kanalaktivität beobachtet und aufgezeichnet werden, sobald Druck auf die Membran ausgeübt wurde, d.h. wenn mit Hilfe einer Spritze eine Saugspannung an die Pipettenöffnung angelegt wurde. Ohne Druck auf die Membran wurden keine spontanen Kanalöffnungen beobachtet. Insgesamt wurden 35 Kanalöffnungen aufgenommen (Tab. 6, 7). Es traten hauptsächlich 2 Typen von dehnungsaktivierten Kanälen auf: Kleine Kanäle, die eine Leitfähigkeit zwischen 600-700 pS (n=16, Tab. 7) zeigten, sowie große Kanäle, die eine genau doppelt so hohe Leitfähigkeit von 1200-1400 pS (n=19, Tab. 6) aufwiesen.

In Abb. 30 ist als Beispiel eine Aufnahme eines *patches* mit Kanälen der kleinen Leitfähigkeit gezeigt. Mit Anlegen des Drucks auf die Membran öffneten sich nacheinander bis zu 12 Kanäle und schlossen alle gleichzeitig, sobald der Druck wieder nachließ. Wie in der Abb. 30 zu sehen ist, zeigten die Kanäle sehr langsame Öffnungskinetiken. Schnell aufeinander folgendes Öffnen und Schließen, ein sogenanntes Flickern der Kanäle konnte nicht beobachtet werden.

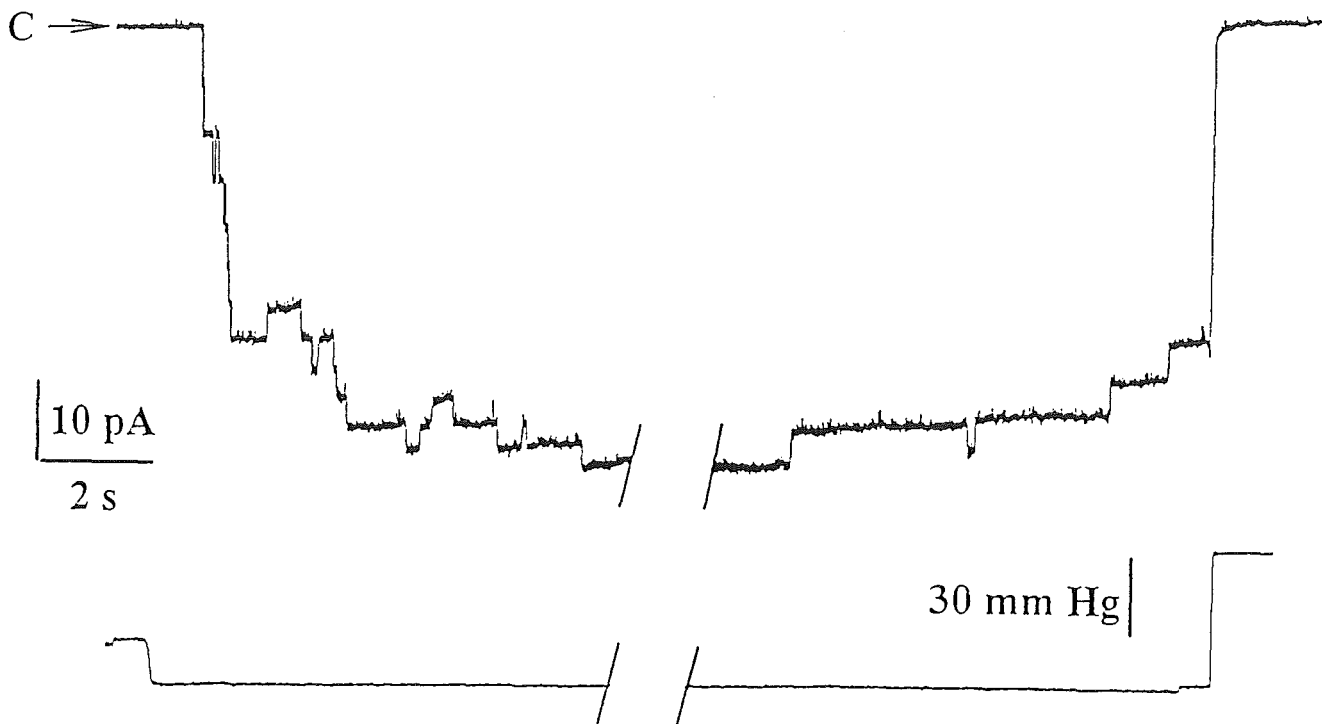


Abb. 30: Aktivierung der 600-700 pS-Kanäle nach Dehnung der Membran. Es handelt sich um den *excised patch* eines Proteoliposoms aus Membranfragmenten von *C. glutamicum*. Durch das Anlegen einer Saugspannung auf die Membran (untere Spur) öffneten sich bis zu 12 identische Kanäle (obere Spur), die sich mit dem Nachlassen des Drucks alle gleichzeitig wieder schlossen. Das Badmedium setzte sich aus 10 mM Hepes-KOH, pH 7,4; 100 mM KCl zusammen. Das Pipettenmedium bestand aus demselben Puffer, dem zusätzlich noch 2 mM CaCl_2 und 5 mM MgCl_2 zugesetzt wurden.

Diese extrem lange Öffnungsdauer wurde jedes Mal im Zusammenhang mit den 600-700 pS-Kanälen beobachtet. Unter konstantem Druck konnten sogar Kanalöffnungen aufgezeichnet werden, die über 1 Minute anhielten, ohne daß zwischendurch ein Flickern oder Schließen auftrat. Die Anzahl der Kanäle, die in einem *patch* beobachtet wurden, schwankte von Fall zu Fall. Am häufigsten wurden 2-5 Kanäle gleichzeitig in einem *patch* beobachtet (72 %, Tab. 6). In 23 % der gebildeten *seals* wurde eine einzige Kanalöffnung verzeichnet. Nur in 6 % der Fälle traten mehr als 5 Kanäle auf (Tab. 6). Das kann damit zusammenhängen, daß die an den Liposomen gebildeten *seals* druckempfindlich sind und reißen, wenn

der Druck zu stark wird. Dies ist möglicherweise in den meisten der Aufnahmen eingetreten bevor die Spannung auf der Membran groß genug war, damit sich alle Kanäle im *patch* öffneten.

Tab. 6: Die Anzahl der beobachteten Kanäle in einem *patch*. Die *patch-clamp*-Experimente wurden an *giant liposoms* aus Membranfragmenten von *C. glutamicum* vorgenommen (s. auch 2.7.5). Die Messungen erfolgten in der *cell-attached*- oder *excised patch*- Konfiguration. Das Badmedium setzte sich aus 10 mM Hepes-KOH, pH 7,4 und 100 mM KCl zusammen. Das Pipettenmedium bestand aus demselben Puffer, dem zusätzlich noch 2 mM CaCl_2 und 5 mM MgCl_2 zugesetzt wurden.

Aktivierte Kanäle in einem <i>patch</i>	1	2	3	4	5	> 5	Gesamt
Anzahl d. Beobachtungen	8	16	3	4	2	2	35
%	23	46	8	11	6	6	100

In der Abb. 31 A ist ein Beispiel für die Kanäle mit großer Leitfähigkeit gezeigt. Mit steigender Saugspannung auf die Membran öffneten sich drei Kanäle, die wieder schlossen, sobald der Druck nachließ. Auch die Kanäle mit den großen Leitfähigkeiten zeigten langsame Öffnungskinetiken. Bezüglich ihrer Öffnungskinetik sind sie also nicht von den Kanälen mit kleiner Leitfähigkeit zu unterscheiden. Im Zusammenhang mit den 1200-1400 pS Kanälen wurden gelegentlich sogenannte *substates* beobachtet, bei denen die Öffnung der Kanäle nur unvollständig erfolgte (Abb. 31 B, Tab. 7). Die *substates* könnten eindeutig von den kleinen Kanälen unterschieden werden. Die Leitfähigkeiten der *substates* waren gewöhnlich kleiner als 600 pS, in der Aufnahme in Abb. 31 B lag sie bei 350 pS. Man sieht hier das typische Auftreten eines *substates* und nicht eines anderen Kanals, da es im Anschluß an ein unvollständiges Schließen eines Kanals erschien und nicht bereits zu Beginn der Öffnung auftrat. Außerdem wurden diese *substates* niemals alleine in einem *patch* beobachtet. Bei den 600-700 pS Kanälen traten keine *substates* auf.

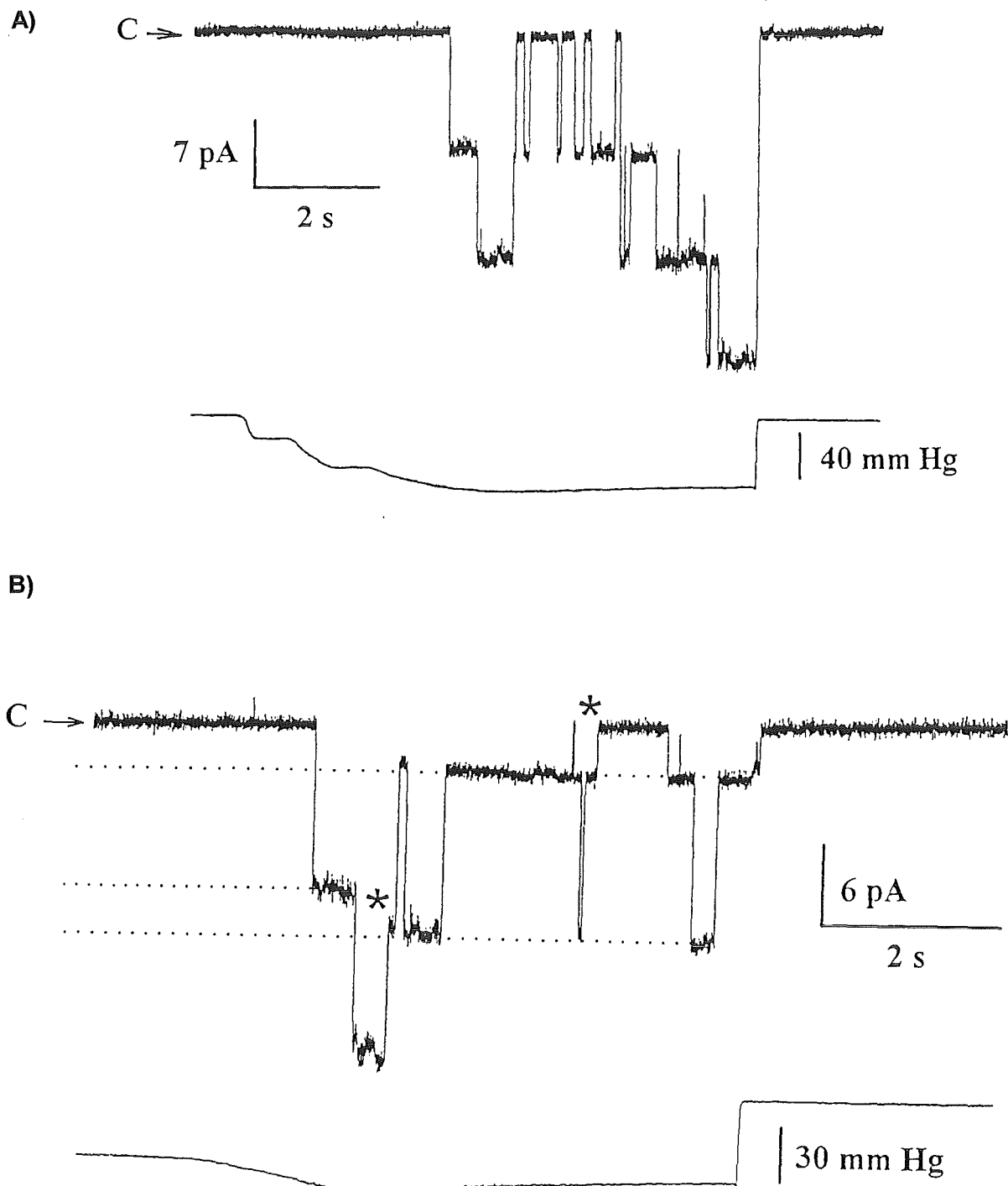


Abb. 31: Aktivierung der 1200-1400 pS Kanäle. A) Nach der Abtrennung eines *patch* aus einem Proteoliposom aus Membranfragmenten von *C. glutamicum* aktivierte das Anlegen einer Saugspannung auf die Membran die Öffnung von drei gleichen Kanälen. Alle anderen Bedingungen waren wie unter Abb. 30 beschrieben. B) Ein *substate* des 1200-1400 pS Kanals in demselben *patch*. Das Anlegen der Saugspannung hatte die Öffnung von zwei gleichen Kanälen zur Folge. Das unvollständige Schließen des einen Kanals (1. Sternchen) wird später gefolgt vom Schließen des dazugehörigen *substate* (350 pS, 2. Sternchen).

In den meisten Fällen konnte nur ein Kanaltyp, d.h. entweder der mit der kleinen oder der mit der großen Leitfähigkeit, innerhalb eines *patches* beobachtet werden (Tab. 7). In einigen Aufnahmen (4 von 35) zeigten sich mehrere Typen druckaktivierter Kanäle in einem *patch*. Nur in zwei Fällen wurden die "kleinen" Leitfähigkeiten zusammen mit den "großen" beobachtet. In den anderen Fällen erschienen die 1200-1400 pS Leitfähigkeiten zusammen mit den sehr großen Leitfähigkeiten von 2,6 nS und größer (Tab. 7).

Tab. 7: Die Anzahl der beobachteten Leitfähigkeiten. Die *patch-clamp*-Experimente wurden wie in Tab. 6 beschrieben durchgeführt.

Leitfähigkeiten (nS)	0,6-0,7	1,2-1,4	1,2-1,4 + 0,6- 0,7	1,2-1,4 + > 2,6	1,2-1,4 + <i>substates</i>	Gesamt
Anzahl	16	11	2	2	4	35

Die minimale Spannung, die zur Aktivierung beider Kanaltypen benötigt wird, lag zwischen 30 mmHg und 100 mmHg und damit in dem Bereich, der bei mechanosensitiven Kanälen an Proteoliposomen und Proteoplasten beobachtet wurde (Gu *et al.*, 1998; Berrier *et al.*, 1996). Die Schwankungen sind darauf zurückzuführen, daß der für die Dehnung der Membran relevante Parameter nicht der meßbare Druck auf die Membran ist, sondern die Membranspannung. Sie ist nach dem Gesetz von Laplace von dem Radius der Krümmung abhängig ($T = rp/2$; T = Membranspannung, p = Druck), und der ist in jedem *patch* unterschiedlich. Die sogenannte Aktivierungsschwelle unterschied sich nicht nur von *patch* zu *patch*, sondern auch dann, wenn der Druck in demselben *patch* wiederholt ausgeübt wurde.

In diesem Fall stieg der zur Aktivierung der Kanäle benötigte Druck bei jeder wiederholten Aktivierung. Dies ist ein Hinweis auf eine Druck-Adaptation. Aus den dargelegten Gründen konnte keine Charakterisierung der Kanäle auf Ebene der Druckempfindlichkeit vorgenommen werden.

3.4.3 Spannungsabhängigkeit und Ionenselektivität der mechanosensitiven Kanäle

Um die Spannungsabhängigkeit sowie die Ionenselektivität beider dominanter Kanaltypen in *C. glutamicum* zu untersuchen, wurden die Kanäle eines *patch* bei verschiedenen angelegten Spannungen in symmetrischem (100 mM KCl auf beiden Seiten des Proteoliposomes) sowie in asymmetrischem Medium (100 mM KCl in der Pipette, 300 mM KCl im Bad)

aktiviert. Der dabei gemessene Strom wird gegen die jeweilige Spannung aufgetragen und man erhält eine sogenannte Strom-Spannungskurve (Abb. 32 und Abb. 33; ■). Diese verläuft für beide Kanäle sowohl im hyper-, als auch im depolarisierten Bereich linear, d.h. die Öffnung der Kanäle erfolgte unabhängig von der Spannung. Unter symmetrischen Bedingungen lag das Umkehrpotential bei 0 mV. Messungen unter asymmetrischen Bedingungen zeigten eine geringfügige Ionenselektivität, die interessanterweise für beide Kanaltypen gleich war. Wurden die Kanäle in 300 mM KCl aktiviert, ließen sie bevorzugt Kationen vor

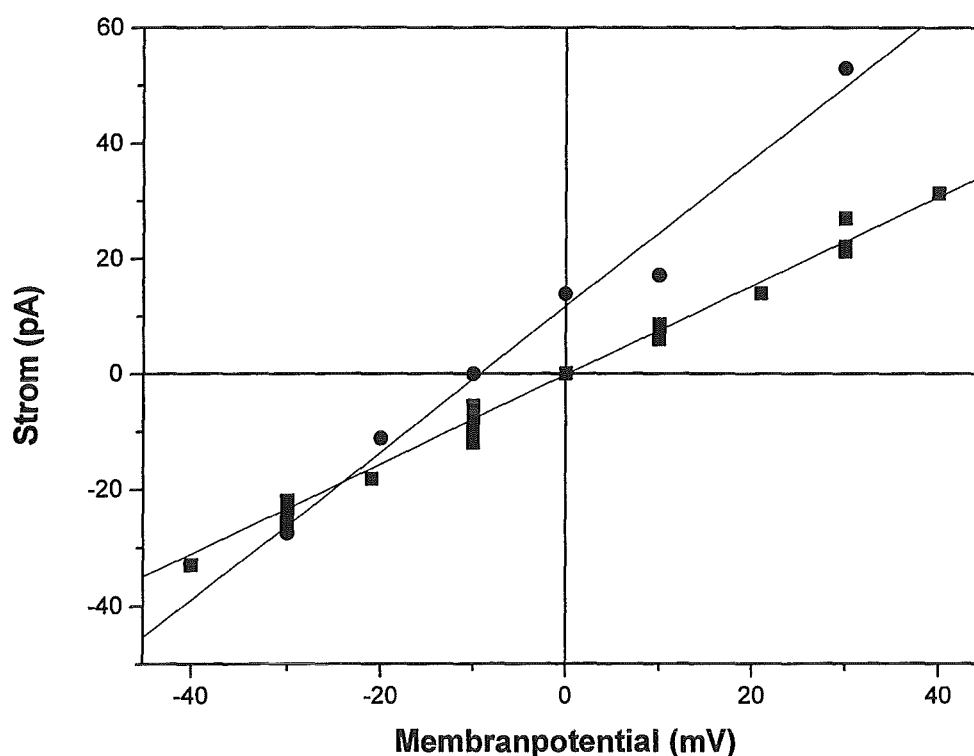


Abb. 32: Strom-Spannungskurve der 600-700 pS Kanäle. Die Größe der Stromflüsse ist gegen die angelegte Membranspannung aufgetragen. Die Aufnahmen wurden von *excised patches* der *giant liposomes* aus Membranfragmenten von *C. glutamicum*, einmal unter symmetrischen Bedingungen (■, 100 mM KCl_{Pip} / 100 mM KCl_{Bad}), einmal unter asymmetrischen Bedingungen (●, 100 mM KCl_{Pip} / 300 mM KCl_{Bad}) erhalten. Während der Spannungsänderungen wurde das Membranpotential wiederholt auf 0 mV gebracht, um zu gewährleisten, daß die Kanäle korrekt öffneten. Unter symmetrischen Bedingungen liegt das Umkehrpotential bei 0 mV (n=6). Die Steigung der Kurve beträgt 0,7 nS. Die Änderung der KCl-Konzentration im Bad auf 300 mM verschiebt das Umkehrpotential auf -9,9 mV (n=4).

Anionen passieren, was durch die Verschiebung des Umkehrpotentials in den negativen Bereich angezeigt wurde. Für die 600-700 pS Kanäle wurde es zu $-9,9$ mV, für die großen Kanäle zu $-6,4$ mV verschoben (Abb. 32 und Abb. 33; ●). Über die Goldman-Hodgkin-Katz Gleichung wurde das Verhältnis der Permeabilitätskoeffizienten für die Ionen berechnet. Es betrug $P_{K^+} / P_{Cl^-} = 2,3$ für die kleinen und $P_{K^+} / P_{Cl^-} = 1,7$ für die großen Kanäle.

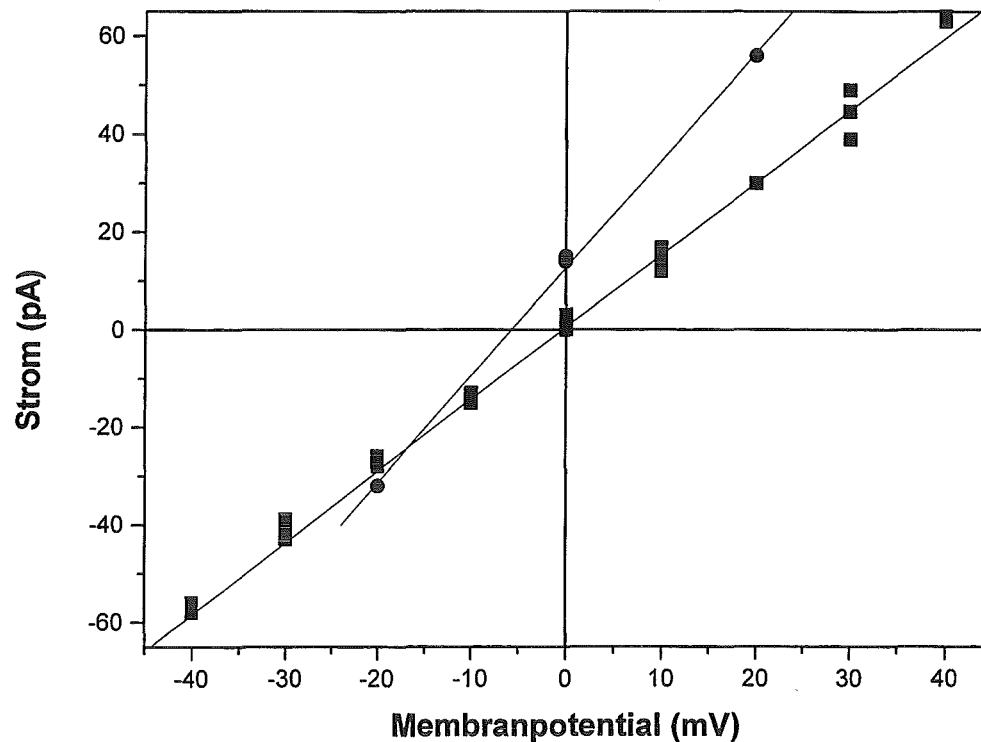


Abb. 33: Strom-Spannungskurve der 1200-1400 pS Kanäle. Alle Bedingungen, wie bei Abb. 32 beschrieben. Unter symmetrischen Bedingungen beträgt die Steigung der Kurve $1,2$ nS (■, $n=6$). Asymmetrische Bedingungen verschieben das Umkehrpotential zu $-6,35$ mV (●, $n=2$).

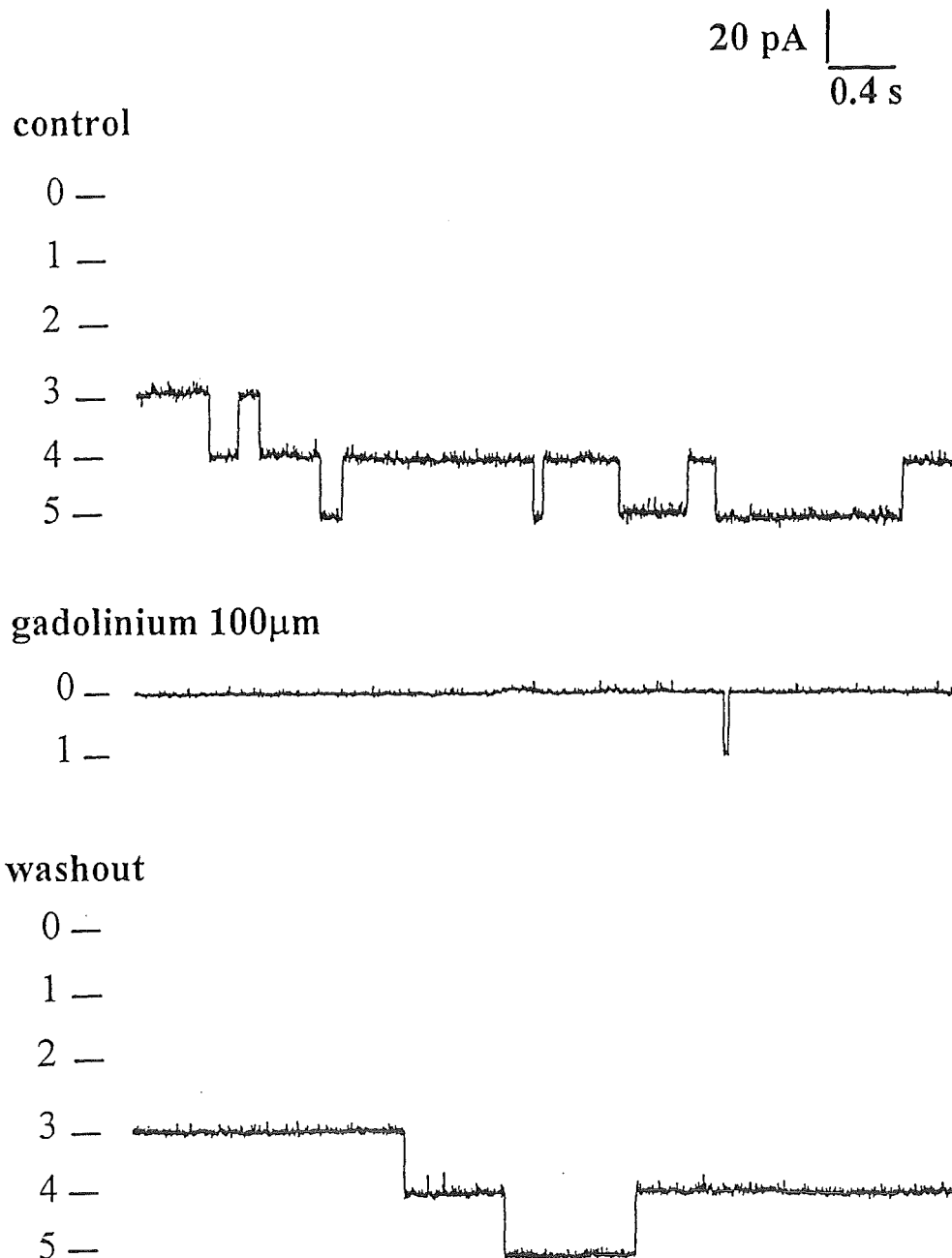


Abb. 34: Der reversible Effekt von Gadolinium auf die 1200-1400 Kanäle. Die Kanäle (obere Spur) wurden durch Anlegen einer Saugspannung von 67 mmHg aktiviert, die über die gesamte Aufnahme aufrechterhalten blieb. Die Perfusion des *patches* mit 100 µM Gd^{3+} hatte das Schließen der Kanäle zur Folge (mittlere Spur). Diese öffneten sich jedoch wieder, als der Inhibitor ausgewaschen wurde (untere Spur). Das Haltepotential betrug -20 mV. Alle anderen Bedingungen waren wie unter Abb. 30 beschrieben.

3.4.4 Inhibierung der Kanalaktivität mit Gd^{3+}

Wie in Kapitel 3.1.6 erwähnt, ist das Lanthanoid Gadolinium ein bekannter Inhibitor mechanosensitiver Kanäle. Obwohl Gd^{3+} *in vivo* auf den hypoosmotisch induzierten Efflux bei *C. glutamicum* keine Hemmung zeigte (s. 3.1.6), sollte die Wirkung des Inhibitors auf die mechanosensitiven Kanäle in *C. glutamicum* geprüft werden, da im *patch-clamp*-Experiment ein direkter Zugang der dreiwertigen Ionen zu den Membranproteinen gegeben war. Es zeigte sich, daß Gd^{3+} beide Kanaltypen inhibierte. In Abb. 34 ist als Beispiel der reversible Effekt des Inhibitors auf die 1,2-1,4 nS-Kanäle dargestellt. Die Kanalaktivität wird fast augenblicklich blockiert, sobald der *patch* mit 100 μM Gd^{3+} gespült wird. Beim Auswaschen des Inhibitors erholt sich die Kanalaktivität wieder und erreicht ihr ursprüngliches Niveau.

4. Diskussion

Das Gram-positive Bodenbakterium *C. glutamicum* ist mit effektiven "Rettungssystemen" ausgerüstet, um kritischen Situationen wie hyper- oder hypoosmotischem Streß zu begegnen. Während hyperosmotischer Streß den Ablauf der Zellfunktionen beeinträchtigt, da durch das abnehmende cytoplasmatische Zellvolumen die Konzentration verschiedener interzellulärer Moleküle u.a. von Enzym-Inhibitoren und störenden Ionen steigt (Csonka, 1989), wirkt sich der hypoosmotische Streß in erster Linie als mechanischer Streß auf die Membran aus. Dies wird auch aus der osmotisch bedingten Volumenzunahme deutlich. Auch wenn Gram-positive Bakterien durch ihre relativ starke Zellwand durch osmotisch bedingten Disruptionen der Zellmembran nicht so bedroht sind wie Gram-negative Bakterien oder gar tierische Zellen, müssen sie einem solchen Streß entgegenwirken. *C. glutamicum* besitzt ein auf hypoosmotischen Schock reagierendes Effluxsystem, das in dieser Arbeit hinsichtlich seiner Funktion und Regulation untersucht wurde.

4.1 Biochemische Untersuchung des hypoosmotisch aktivierten Effluxsystems in *C. glutamicum*

Das in dieser Arbeit untersuchte Effluxsystem reagiert auf hypoosmotischen Streß in einer Weise, die den in *E. coli* und *L. plantarum* beschriebenen mechanosensitiven Kanälen ähnlich ist (Berrier *et al.*, 1992; Schleyer *et al.*, 1993; Glaasker *et al.*, 1996). Dennoch zeigen die in *C. glutamicum* beobachteten Kanäle eine Reihe besonderer Eigenschaften hinsichtlich ihrer Transportspezifität und der Regulation der Effluxaktivität.

Kanal- oder Carrier-Mechanismus

Der hypoosmotisch stimulierte Efflux der niedermolekularen Substanzen kann im Prinzip sowohl auf eine disruptierte Membran als auch auf die Aktivität eines Kanalproteins oder eines Efflux-Transport-Proteins zurückzuführen sein. Die einfachste Erklärung, daß nämlich eine defekte Membran den beobachteten Efflux vermittelt, kann für *C. glutamicum* ausgeschlossen werden. Dagegen spricht die beobachtete Präferenz für einige Effluxsubstrate. Die Beteiligung eines Transport-Proteins ist sehr unwahrscheinlich, wie einige experimentelle Daten verdeutlichen. Da wäre zum einen die extrem hohe Effluxrate zu nennen, von der unter bestimmten Bedingungen ein Wert von mindestens $6000 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g TM}^{-1}$ angenommen werden konnte. Sie liegt weit über denen der bislang untersuchten Transport-Proteine in *C. glutamicum*, dessen schnellstes das voll induzierte Glycinbetain-Aufnahme-

System BetP mit einer Transportrate von $110 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g TM}^{-1}$ ist (Farwick *et al.*, 1995). Unter isoosmotischen Bedingungen konnte trotz des extrem hohen Substratgradienten kein signifikanter Efflux beobachtet werden. Die Zugabe von Transportsubstrat, genauer gesagt von Glycinbetain in das Außenmedium hatte keinen Einfluß auf die Eigenschaften des hypoosmotisch aktivierten Efflux. Allerdings wurde nach Zugabe von unmarkiertem Glycinbetain unter isoosmotischen Versuchsbedingungen ein langsamer Efflux von markiertem Substrat beobachtet. Dieser Efflux kann eindeutig der Aktivität des Glycinbetain-Aufnahmesystems BetP zugeordnet werden (Farwick *et al.*, 1995; Peter *et al.*, 1996). Als sekundäres Transportsystem vermittelt BetP im thermodynamischen Gleichgewicht den kontinuierlichen Austausch von internem und externem Substrat. Durch die Zugabe von zusätzlich unmarkiertem Glycinbetain wird der Anteil der radioaktiv markierten Moleküle im Medium so verdünnt, daß die Aufnahme von [^{14}C]-Glycinbetain zugunsten der Aufnahme von unmarkiertem Glycinbetain eingestellt wird. Dadurch wird der reine Efflux der [^{14}C]-Glycinbetain-Moleküle sichtbar. Um die Richtigkeit dieser Interpretation zu zeigen, wurde der Entkoppler CCCP zu den mit [^{14}C]-Glycinbetain beladenen Zellen gegeben. Dies führte zum Zusammenbruch des Membranpotentials der Zellen und damit zu einer signifikanten Erniedrigung der Wiederaufnahme des Substrates gegen den Konzentrationsgradienten. Folglich konnte nach dieser Behandlung ebenfalls ein Efflux von radioaktiv markiertem Glycinbetain mit einer vergleichbaren Transportrate beobachtet werden. Der geringfügige Teil an markiertem Substrat, der direkt nach Zugabe von CCCP aus den Zellen austritt, ist auf ein neues, niedrigeres Gleichgewicht zwischen Aufnahme und Efflux von internem/externem Glycinbetain im *steady state* zurückzuführen, das sich nach dem Kollaps des Membranpotentials einstellt. Eine endgültige Unterscheidung zwischen der Aktivität des Aufnahmesystems und der der Effluxkanäle ist leider zur Zeit nicht möglich. Zum einen konnte bislang kein spezifischer Inhibitor für das BetP-System gefunden werden. Zum anderen kann ein von Peter (1997) hergestellter rekombinanter Stamm von *C. glutamicum*, DHP1, dem das Gen *betP* fehlt, nicht für die Messungen verwendet werden, da es nicht möglich ist, diese Mutantenzellen mit Glycinbetain zu beladen. Abschließend läßt sich sagen, daß keine Hinweise darauf gefunden werden konnten, daß der auf einen hypoosmotischen Schock folgende schnelle Efflux in *C. glutamicum* unter Beteiligung eines Transport-Proteins erfolgt. Dies steht im Gegensatz zu den Befunden bei *L. plantarum*, an dessen hypoosmotisch stimuliertem Efflux sowohl Kanäle als auch Transport-Proteine beteiligt sind (Glaasker *et al.*, 1996).

Regulation des Efflux

Es liegt nahe, daß die Kanalaktivität in den Zellen gut kontrolliert werden muß, da diese sonst Gefahr läuft, andere wichtige Zellfunktionen zu beeinträchtigen. Auf der Ebene der Genexpression konnte keine Regulation beobachtet werden. Das scheint vernünftig, erfordert doch ein hypoosmotischer Schock, der dem Bodenbakterium *C. glutamicum* z.B. in Form eines Regenschauers sehr plötzlich widerfahren kann, eine unmittelbare Reaktion von den Zellen. Darauf können die Bakterien nur vorbereitet sein, wenn die Kanäle in der Membran konstitutiv vorhanden sind.

Auf der Ebene der Aktivität erfolgt bei *C. glutamicum* allerdings eine strenge Regulation. Bei den hier vorliegenden Untersuchungen wurde zum ersten Mal deutlich gezeigt, daß die Kanäle, die den Solut-Efflux im Anschluß an hypoosmotischen Streß vermitteln, ausschließlich von der osmotischen Potentialdifferenz über der Membran abhängig sind. Wie der abgestuft erfolgende Efflux nach unterschiedlich starkem hypoosmotischem Streß zeigt, öffnen sich die Kanäle als Reaktion auf einen osmotischen Gradienten über der Membran gerade solange, bis ein Ausgleich erreicht ist. Die interne Konzentration der kompatiblen Solute weist eine lineare Abhängigkeit von der Änderung der externen Osmolalität auf. Diese Reaktion ist vollkommen unabhängig davon, welche Art von Osmolyt, ionisch oder nicht-ionisch, die osmotischen Potentialdifferenz hervorruft. Darüberhinaus weisen die Versuche, in denen die Zellen unterschiedlichen Beladungsverfahren unterworfen waren, die Zellen als perfekte Osmometer aus, da die Reaktion der Bakterienzellen mit der Änderung der externen Osmolalität korrelierte. Die Zellantworten sind sehr gut an das Ausmaß des osmotischen Stresses angepaßt. Dieser Befund deutet darauf hin, daß es sich bei den hypoosmotisch aktivierten Kanäle in *C. glutamicum* genauso wie bei den in anderen Bakterien hypoosmotisch aktivierten Systemen um mechanosensitive Kanäle handelt (Berrier *et al.*, 1992; Cui *et al.*, 1995). Hypoosmotischer Streß wirkt unmittelbar als mechanischer Druck auf die Membran, der von diesen speziellen Kanälen direkt wahrgenommen werden kann (s.u.).

Die Spezifität des hypoosmotisch aktivierten Efflux

Eine interessante Eigenschaft des Systems in *C. glutamicum* ist der bevorzugte Transport von einigen kompatiblen Soluten. Damit unterscheidet es sich z. B. grundlegend von dem in *S. typhimurium* beobachteten Efflux, wo in einem relativ langsamen, unspezifischen Prozeß im Anschluß an hypoosmotischen Streß sowohl Glycinbetain als auch Serin ausgeschleust werden (Koo *et al.*, 1991). *E. coli* zeigt bei moderatem hypoosmotischem Streß allerdings ebenfalls eine Spezifität für bestimmte kompatible Solute. Es treten bevorzugt K^+ , Glutamat und Trehalose aus (Schleyer *et al.*, 1993). Bei starkem hypoosmotischem Schock jedoch

werden nicht nur alle niedermolekularen Substanzen, sondern auch größere Moleküle wie das für die Zelle wertvolle ATP ausgeschleust (Tsapis und Kepes, 1977; Berrier *et al.*, 1992). Dies ist bei *C. glutamicum* nicht der Fall. Selbst nach starkem hypoosmotischem Schock treten hauptsächlich die kompatiblen Solute Prolin und Glycinbetain aus. Ectoin, ebenfalls eine osmoprotektive Substanz, kann die Kanäle nicht im gleichen Ausmaß passieren. Auch die Ionen Na^+ und K^+ werden im Vergleich zu Prolin und Glycinbetain zurückgehalten. Der Ectoin- und K^+ -Efflux zeigt trotz seines geringen Ausmasses eine lineare Abhängigkeit von der Höhe der angelegten osmotischen Potentialdifferenz. Dies ist beim Efflux der anderen untersuchten Aminosäuren nicht der Fall. Im Falle von Alanin, einem relativ kleinen Molekül, ist ein Beitrag eines passiven Transports, d.h. der Diffusion über die Cytoplasmamembran, am beobachteten Efflux nicht auszuschließen. Die Gefahr, daß die Ergebnisse der Untersuchungen zur Spezifität durch Wiederaufnahme der ausgeschleusten Moleküle unmittelbar nach erfolgtem hypoosmotischen Schock fehlinterpretiert worden sein könnten, konnte für alle untersuchten Substanzen ausgeschlossen werden.

Die Eigenschaften der hypoosmotisch aktivierten Effluxkanäle in *C. glutamicum* unterscheiden sich also von den entsprechenden Systemen in *E. coli*. Das wird am Beispiel von ATP besonders deutlich, das in *C. glutamicum* im Gegensatz zu *E. coli* unter allen getesteten Bedingungen zurückgehalten wurde. Interessanterweise bevorzugt *E. coli* unter den selektiven Bedingungen eines moderaten hypoosmotischen Schocks mit Glutamat, K^+ und Trehalose andere Moleküle als *C. glutamicum* (Schleyer *et al.*, 1993). Beide Bakterien unterscheiden sich aber ebenfalls in der Art der kompatiblen Solute, die sie unter hyperosmotischen Bedingungen bevorzugt akkumulieren. *E. coli* nimmt nämlich hauptsächlich K^+ und Glutamat auf, die in der Langzeitantwort auf hyperosmotischen Streß durch von den Zellen synthetisierte Trehalose ersetzt werden (Larsen *et al.*, 1987; Dinnbier *et al.*, 1988). Bei *C. glutamicum* hingegen stellen Glycinbetain und Prolin die bevorzugten Osmoprotektanten dar (Csonka, 1989; Frings *et al.*, 1993). Unter diesem Gesichtspunkt erscheint die jeweilige Spezifität des Efflux der beiden Bakterienstämme sinnvoll. Hyper- und hypoosmotische Regulation scheinen demnach in den Bakterien aufeinander abgestimmt zu sein. Unter bestimmten Umständen wurde bei *C. glutamicum* auch Trehalose als osmoprotektive Substanz akkumuliert (Frings *et al.*, 1993; Skjerdal *et al.*, 1996). Unter den Wachstumsbedingungen dieser Arbeit konnte die Akkumulation von Trehalose allerdings nicht beobachtet werden. Aus diesem Grunde liegen auch keine Daten über den hypoosmotisch aktivierten Efflux dieser Substanz vor.

Solange die molekulare Identität der mechanosensitiven Kanäle in *C. glutamicum* nicht aufgeklärt wird, kann die beobachtete Reihenfolge der Permeabilitäten sowohl mit der Spezifität eines Kanaltyps, als auch mit der Beteiligung mehrerer Kanaltypen, die eine unterschiedliche

Spezifität aufweisen, erklärt werden. So scheint z. B. die Existenz eines eigenen Kanals für den Efflux der K^+ -Ionen unter den Bedingungen eines hypoosmotischen Schocks nicht unwahrscheinlich. Unabhängig davon sollte betont werden, daß das Fehlen eines ausgeprägten schnellen Effluxes einer bestimmten Substanz nach osmotischem Schock diese als Substrat der Effluxkanäle in *C. glutamicum* ausschließt. Es sollte außerdem erwähnt werden, daß die hier beschriebenen Effluxkanäle nicht mit dem in *C. glutamicum* beobachteten Glutamat-Efflux in Zusammenhang stehen, der unter bestimmten metabolischen Situationen beobachtet wurde (Lambert *et al.*, 1995). Obwohl der Efflux, der bei der Glutamat-Produktion auftritt, in seiner Aktivität durchaus von externen Änderungen der Osmolalität beeinflusst wird, konnte gezeigt werden, daß er von einem energieabhängigen, spezifischen Transportsystem vermittelt wird (Gutmann *et al.*, 1992; Krämer *et al.*, 1994).

Energetische Konsequenz des hypoosmotisch stimulierten Efflux

In Kapitel 3.2 konnte gezeigt werden, daß die Kanalaktivität bei einmalig erfolgreichem hypoosmotischem Schock allein von der osmotischen Potentialdifferenz über der Membran abhängig ist. In einem weiteren Experiment wurde untersucht, wie sich die Kanäle bei einer kontinuierlichen Senkung der externen Osmolalität verhalten. Es stellte sich heraus, daß die kontinuierliche Senkung der äußeren Osmolalität zu einer kontinuierlichen Abnahme des internen Glycinbetain-Gehalts führte. So eindeutig sich dieses Ergebnis ausnimmt, seine Interpretation ist es nicht. Der so beobachtete Efflux läßt sich nämlich einerseits mit ständigen, sehr kurzen Kanal-Öffnungen erklären, die in allen Zellen als Reaktion auf die kleinen Osmolalitätsänderungen stattfinden. Andererseits könnten stufenweise erfolgende Kanalöffnungen einzelner Zellen, die innerhalb der Zellpopulation zeitlich verschoben auftreten und deshalb über die gesamte Population gemittelt werden, ebenfalls zu dem beobachteten Resultat führen. Eine genaue Diskriminierung zwischen diesen beiden Möglichkeiten könnte nur anhand von Untersuchungen an einzelnen Zellen geschehen, was bislang nicht möglich ist.

Trotzdem haben die Kanalaktivitäten als Reaktion auf äußere osmotische Veränderungen Konsequenzen für die energetische Situation der Zellen. Während der ATP-Gehalt in den Zellen im Anschluß an einen hypoosmotischen Schock vorübergehend absinkt, bevor er wieder den Ausgangswert erreicht, bleibt das Membranpotential über den gesamten Zeitraum des hypoosmotischen Stresses erniedrigt. Das bedeutet, daß die Streßreaktion mit einem energetischen Kostenaufwand für die Zellen verbunden ist.

Unter Berücksichtigung des spezifischen Zellvolumens ergibt sich für den unter kontinuierlichem hypoosmotischen Streß beobachteten Efflux eine Transportrate von

$30 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g TM}^{-1}$. Angesichts der unter starkem hypoosmotischem Schock beobachteten hohen Effluxrate von mindestens $6000 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g TM}^{-1}$ bedeutet dies, daß unter den kontinuierlichen Osmolalitätsänderungen zu einem bestimmten Zeitpunkt maximal 1 % der vorhandenen Kanäle vollständig geöffnet sind. Eine andere Art der Betrachtung geht davon aus, daß sich die Zellen während des Versuchs in unterschiedlichen Zuständen befinden. Vereinfacht soll angenommen werden, daß sich lediglich zwei unterschiedliche Zellpopulationen während des Experiments in der Lösung befinden. Die eine Zellpopulation befindet sich in einem komplett geschlossenen Zustand, in dem ihr Membranpotential unverändert hoch ist, die andere Zellpopulation ist komplett geöffnet, was ein Membranpotential von Null nach sich ziehen würde. In den Experimenten wurde in der frühen Efflux-Phase nach Einsetzen des osmotischen Stresses aber eine durchschnittliche Membranpotential-Senkung von 15 mV beobachtet. Dies entspräche einem Anteil von 40 % geöffneter Zellen zum Zeitpunkt der Messung. Damit müßten allerdings mehr als 1 % der Kanäle geöffnet sein, d.h. es ist davon auszugehen, daß das zwei-Populationen-Modell auf diese Situation nicht zutrifft. Gegen das Modell der zwei Populationen, die sich aus komplett geöffneten bzw. komplett geschlossenen Zellen zusammensetzen, spricht auch eine Beobachtung, die bei den elektrophysiologischen Messungen der mechanosensitiven Kanäle gemacht wurde. Dort zeigte sich nämlich, daß die Anzahl der geöffneten Kanäle mit steigendem Druck zunimmt (Berrier *et al.*, 1996). Dies zeigt, daß nur bei sehr starker Membrandehnung, d.h. bei sehr starkem osmotischem Streß, alle in der Membran vorhandenen Kanäle geöffnet sind, und das mit der Variation der geöffneten Kanäle die Abstimmung auf die Stärke des osmotischen Stresses erfolgt.

4.2 Elektrophysiologische Untersuchung der mechanosensitiven Kanäle in der Cytoplasmamembran von *C. glutamicum*

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die cytoplasmatische Membran von *C. glutamicum* eine Kanalaktivität enthalten, die empfindlich auf mechanischen Streß, d.h. auf Dehnen der Membran, reagiert. Während der Mechanismus der mechanischen Erregbarkeit noch nicht verstanden wird, gibt es hinsichtlich der physiologische Funktion der mechanosensitiven Kanälen in Bakterien klare Hinweise, daß sie eine Rolle bei der hypoomotischen Regulation spielen (Ajouz *et al.*, 1998; Berrier *et al.*, 1992; Cui *et al.*, 1995). Für *C. glutamicum* konnte der direkte Nachweis in dieser Arbeit leider nicht erbracht werden. Zum einen war es nicht möglich, *patch-clamp*-Messungen an Protoplasten, also an der nativen Membran, durchzuführen. Im Gegensatz zu *E. coli* und *B. subtilis* (Zoratti und Petronilli, 1988; Szabó *et al.*, 1992; Sukharev *et al.*, 1997) konnten mit den Zellen von *C. glutamicum* keine *giant sphaeroblasts* erhalten werden, die für den Einsatz in *patch-clamp*-Experimen-

ten geeignet gewesen wären. Da Proteoliposomen nicht besonders widerstandsfähig gegenüber erhöhtem Druck sind, konnten unter diesen Bedingungen keine direkte osmotische Stimulation der Kanäle untersucht werden. Bei den Versuchen zur Wirksamkeit des Inhibitors für mechanosensitive Kanäle, Gd^{3+} , traten Diskrepanzen zwischen der Inhibierbarkeit des hypoomotisch stimulierten Efflux *in vivo* und der mechanosensitiven Kanalaktivität *in vitro* auf. Während der Inhibitor den osmotisch induzierten Efflux eher zu verstärken als zu hemmen schien, wurde die mechanosensitive Kanalaktivität im *patch-clamp*-Experiment durch die Zugabe des Lanthanoids reversibel gehemmt. Allerdings ging der Hemmung im *patch-clamp*-Experiment eine gesteigerte Kanalaktivität voraus. Diese Beobachtung liefert eine Erklärung für die Wirkung des Inhibitors auf den Solut-Efflux: Die anfängliche Aktivitätssteigerung führt zu einem massiven Verlust der akkumulierten kompatiblen Solute, der auch bei einer frühzeitigen Zugabe des Inhibitors zu den Zellen nicht mehr ausgeglichen werden konnte. Die Wirkungsweise von Gd^{3+} ist aber auch bei den Untersuchungen in *E. coli* nicht so eindeutig, wie die ersten Experimente von Berrier *et al.* (1992) andeuteten. Elektrophysiologisch sind alle drei der verschiedenen Kanaltypen in *E. coli* mit dem Lanthanoid inhibierbar. *In vivo* wird dagegen nur der osmotisch aktivierte Efflux der größeren Substanzen, wie ATP, Thioredoxin oder Lactose gehemmt, der Efflux von Glutamat, K^+ oder Glycinbetain blieb dagegen von dem Inhibitor unbeeinflusst (Berrier *et al.*, 1992; Ghazi, persönliche Mitteilung). Es scheint schwierig zu sein, die effektive Konzentration des Inhibitors einzustellen, die *in vivo* von verschiedenen Faktoren abhängig sein kann.

Die exakte Regulation des hypoosmotisch induzierten Efflux auf der Aktivitätsebene wird jedoch durch das exakte Öffnungsverhalten der mechanosensitiven Kanäle widerspiegelt, die nur durch Dehnung der Membran aktiviert werden und schließen, sobald der Druck auf die Membran aussetzt. Zusammen mit der Tatsache, daß die beobachteten Kanäle in *C. glutamicum* den in anderen Bakterien untersuchten Kanälen in vielerlei Hinsicht ähnlich sind, liefern diese Argumente einen starken Hinweis, daß die charakterisierten mechanosensitiven Kanäle für den osmotisch induzierten Efflux in *C. glutamicum* verantwortlich sind.

Die Eigenschaften der mechanosensitive Kanäle in *C. glutamicum*

Patch-clamp- Experimente mit Protoplasten, also an der nativen Membran, führten zu keinem Ergebnis. Um die mechanosensitiven Kanäle in der cytoplasmatischen Membran von *C. glutamicum* zu charakterisieren, wurden deshalb gereinigte Membranfragmente in künstliche Liposomen eingebracht und elektrophysiologisch untersucht. Obwohl Untersuchungen an Proteoliposomen die Gefahr bergen, nicht alle in der Membran vorhandenen Kanäle zu erfassen, weisen die vorherrschenden Kanäle mit Leitfähigkeiten von 600-700 pS und 1200-1400 pS darauf hin, daß in der cytoplasmatischen Membran von *C. glutamicum* hauptsäch-

lich diese zwei Typen mechanosensitiver Kanäle vorkommen. Sie zeigen Eigenschaften, die bislang bei allen bakteriellen mechanosensitiven Kanälen beobachtet wurden: eine sehr große Leitfähigkeit, eine schwache Selektivität, die Fähigkeit, in künstlichen Lipiddoppelschichten rekonstituiert und durch das dreiwertige Lanthanoid Gadolinium inhibiert zu werden.

Auffallend ist allerdings, daß nur zwei Typen von dehnungsaktivierten Kanälen in den Proteoliposomen von *C. glutamicum* detektiert wurden und daß ihre Eigenschaften große Ähnlichkeiten zueinander aufweisen. Sie zeigen beide eine sehr langsame Öffnungskinetik und die gleiche schwache Kationen-Selektivität. Außerdem stimmen sie in ihrem spannungsunabhängigen Öffnungsverhalten überein. Aufgrund ihres extrem langsamen Schließverhaltens konnte keine Korrelation zwischen Öffnungswahrscheinlichkeit und angelegtem Druck berechnet werden. Die Kanäle lassen sich also lediglich anhand ihrer Leitfähigkeiten unterscheiden. Diese weisen ein stabiles Verhältnis (Faktor zwei oder größer) zueinander auf. Das steht im Gegensatz zu den bei *E. coli* gut charakterisierten Typen mechanosensitiver Kanäle. Diese drei Gruppen unterscheiden sich nämlich in allen oben genannten Kriterien voneinander (Berrier *et al.*, 1996). Daraus konnte gefolgert werden, daß es sich bei den mechanosensitiven Kanälen in *C. glutamicum* nicht um zwei unterschiedliche Arten von Membranproteinen handelt, sondern um ein und denselben Kanaltyp. Damit wäre die größere beobachtete Leitfähigkeit auf die kooperative Öffnung von zwei kleinen Kanälen zurückzuführen. Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß es sich bei dem funktionellen Kanal um Oligomere, also Untereinheiten desselben Proteins handelt, die sich unterschiedlich in der Membran organisieren. Damit wäre ebenfalls eine Erklärung für das Auftreten der sehr großen Leitfähigkeiten gefunden, die von einzelnen Kanalöffnungen schwerlich vermittelt werden können. Es erscheint wahrscheinlicher, daß eine unter bestimmten Bedingungen erfolgende Ausbildung von Oligomer-Aggregaten für diesen massiven Stromfluß verantwortlich ist. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die beiden in *C. glutamicum* beobachteten Leitfähigkeiten tatsächlich zu zwei komplett verschiedenen Kanälen gehören. Dafür spricht die Tatsache, daß in einem *patch* selten zwei unterschiedliche Leitfähigkeiten zusammen beobachtet werden konnten, nämlich nur in 12 % aller Messungen. Damit trat dieser Fall jedoch doppelt so häufig auf, wie bei den Messungen in *E. coli* beobachtet wurde (Berrier *et al.*, 1996). Diese Untersuchungen sind allerdings statistisch besser abgesichert, da die Stichprobe doppelt so groß war.

Der molekulare Ursprung der mechanosensitive Kanäle in *C. glutamicum*

Die Deletion des Gens für den großen mechanosensitiven Kanal in *E. coli*, *MscL*, resultiert in der Unterdrückung der *MscL*-Kanalaktivität, während die anderen mechanosensitiven Kanäle

davon unbeeinflusst bleiben (Ajouz *et al.*, 1998). Das deutet darauf hin, daß dieses Bakterium mindestens zwei Gene besitzt, die für mechanosensitive Kanal-Untereinheiten kodieren. In *E. coli* scheinen die verschiedenen mechanosensitiven Kanäle ein redundantes System zu bilden, da die hypoosmotische Regulation auch ohne die Anwesenheit der MscL-Kanäle vollständig funktionstüchtig ist (Ajouz *et al.*, 1998). Das Genom von *C. glutamicum* ist mit 3,1 Mbp (Bathe *et al.*, 1996) deutlich kleiner, als das von *E. coli* mit 4,6 Mbp. Es ist außerdem bekannt, daß *C. glutamicum* eine geringere Anzahl von Isoenzymen besitzt. Angesichts dieser Tatsachen würde es nicht überraschen, wenn *C. glutamicum* nur mit einer minimalen Anzahl mechanosensitiver Kanäle ausgestattet wäre. In der Tat besteht angesichts der vorliegenden Ergebnisse die Möglichkeit, daß *C. glutamicum* nur ein einziges Gen besitzt, das für einen mechanosensitiven Kanal kodiert.

Es wurde versucht, das Gen für den MscL in *C. glutamicum* mittels PCR unter Einsatz von degenerierten Oligonukleotiden, die von den hochkonservierten Regionen der MscL-Sequenz abgeleitet wurden, zu isolieren. Die *primer* wurden unter Berücksichtigung der Sequenzinformationen von 9 unterschiedlichen Spezies (Moe *et al.*, 1998) inklusive des zu *C. glutamicum* eng verwandten Organismus *M. tuberculosis* entworfen. Neben den hochkonservierten Regionen wurde zur *primer*-Synthese zusätzlich ein Bereich berücksichtigt, der sich bei Versuchen mit *E. coli*-Mutanten als essentiell für die Kanalfunktion erwiesen hatte (Häse *et al.*, 1997). Trotz aller Anstrengungen ist es nicht gelungen, ein PCR-Fragment zu isolieren, das Ähnlichkeiten mit dem *mscL*-Gen aufwies. Der Einsatz von Southern-Blot-Techniken führte ebenfalls zu keinem positiven Resultat. Ob *C. glutamicum* ein *mscL* besitzt, das in den konservierten Regionen von den anderen bekannten Genen abweicht, oder ob das Gen tatsächlich nicht vorhanden ist, kann mit diesem Ergebnis nicht beantwortet werden.

Die mechanosensitiven Kanäle in *B. subtilis* zeigen zum einen ähnliche Eigenschaften wie die von *C. glutamicum*. Bei *patch-clamp*-Untersuchungen an Protoplasten wurde im Zusammenhang mit den mechanosensitiven Kanälen, deren Leitfähigkeiten sich um den Faktor 2 voneinander unterscheiden (Szabó *et al.*, 1992), ebenfalls sehr große Leitfähigkeiten bis zu 6 nS in symmetrischem KCl-Puffer beobachtet. Die Autoren interpretierten diese Leitfähigkeiten mit Kanalaggregationen, die ein kooperatives Öffnungsverhalten aufweisen (Zoratti und Petronilli, 1988). Andererseits wurden im Gegensatz zu *C. glutamicum* in *B. subtilis* eine größere Anzahl unterschiedlicher Leitfähigkeiten beobachtet, was auf das Vorhandensein separater mechanosensitiver Kanäle schließen läßt (Ghazi, persönliche Mitteilung). Insofern nimmt *C. glutamicum* mit seiner geringen Anzahl mechanosensitiver Leitfähigkeiten eine besondere Stellung ein, die durchaus mit dem kleineren Genom in Einklang steht.

Kann anhand der elektrophysiologischen Untersuchungen eine Aussage darüber getroffen werden, ob einer der in *C. glutamicum* beobachteten mechanosensitiven Kanäle mit dem MscL verwandt ist? Die Leitfähigkeiten der beobachteten "großen" mechanosensitiven Kanäle in *C. glutamicum* liegen mit 1200-1400 pS in dem Bereich des MscL. Die beobachtete leichte Kationenselektivität und das sehr langsame Öffnen und Schließen der 1200-1400 pS-Kanäle, deren Öffnungskinetik ungefähr zehnmal langsamer ist, als das des langsamsten MscL-Homologs mit einer maximalen Öffnungszeit von 30 ms (Moe *et al.*, 1998), lassen sie eher der Gruppe der kleinsten mechanosensitiver Kanäle in *E. coli*, den MscM, zugehörig erscheinen (Berrier *et al.*, 1996). Die mechanosensitiven Kanäle in *E. coli* und *B. subtilis* zeigen ein unterschiedliches Erscheinungsbild im *patch-clamp*-Experiment, obwohl beide Organismen den großen mechanosensitiven Kanal, MscL, besitzen (Berrier *et al.*, 1996; Zoratti und Petronilli, 1988; Zoratti *et al.*, 1990). Kürzlich ist die Aktivität von MscL-ähnlichen Proteinen aus sieben verschiedenen Organismen mit Hilfe der *patch-clamp*-Technik untersucht worden, indem sie heterolog in ein *E. coli*-System exprimiert wurden, dem das native *mscL* fehlte (Moe *et al.*, 1998). Obwohl sich die an Protoplasten untersuchten Kanäle darin ähnelten, daß sie alle auf mechanischen Streß in der Membran reagierten, unterschieden sie sich alle in ihrer Öffnungskinetik und im Grad der Mechanosensitivität. Die in den *patch-clamp*-Studien gewonnenen Informationen lassen also keine Aussage über den molekularen Ursprung der mechanosensitiven Kanäle zu.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das System in *C. glutamicum*, das die hypoosmotische Streßantwort vermittelt, hinsichtlich seiner Funktion und Regulation untersucht.

Es konnte gezeigt werden, daß der hypoosmotisch aktivierte Efflux in *C. glutamicum* durch Membrankanäle vermittelt wird. Dafür spricht die hohe Effluxrate, die Mindestwerte von $6000 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ TM einnehmen kann, sowie die Tatsache, daß die Zugabe von externem, unmarkiertem Substrat ohne Einfluß bleibt.

Die Regulation der Kanalaktivität erfolgt allein auf Aktivitätsebene, eine Regulation auf Ebene der Expression konnte nicht beobachtet werden. Der Solut-Efflux ist ausschließlich von der Differenz des osmotischen Potentials über der Membran abhängig. Die Art des kompatiblen Solute (Prolin oder Glycinbetain) oder die Art der extern osmotisch aktiven Substanz (NaCl oder Sorbitol) spielt dabei keine Rolle.

Der hypoosmotisch aktivierte Efflux kompatibler Solute in *C. glutamicum* ist ein spezifischer Prozeß. Es werden bevorzugt die kompatible Solute Glycinbetain und Prolin transportiert, andere untersuchte niedermolekulare Substanzen und Ionen können die Kanäle in geringerem Maße oder gar nicht nutzen. ATP wird vollständig zurückgehalten. Damit unterscheidet sich *C. glutamicum* von anderen untersuchten Bakterien.

Eine langsame und kontinuierliche Senkung der externen Osmolalität führt zu einem langsamen und kontinuierlichen Verlust an internem Glycinbetain. Dabei kann zwischen einer ständig erfolgenden, aber schwachen Effluxaktivität aller Zellen und zeitlich abgestuft auftretenden Kanalöffnungen einzelner Zellen, die sich mitteln, nicht unterschieden werden. Die Öffnung der Kanäle hat aber in jedem Fall energetische Konsequenzen für die Zellen, wie das Absinken von ATP-Gehalt und Membranpotential verdeutlichen.

Mit Hilfe von *patch-clamp*-Messungen an Proteoliposomen konnten mechanosensitive Kanäle in der Cytoplasmamembran von *C. glutamicum* nachgewiesen und charakterisiert werden, die denen der bislang untersuchten bakteriellen mechanosensitiven Kanälen ähnlich sind. Die Besonderheit bei *C. glutamicum* liegt in der geringen Anzahl der beobachteten dehnungsaktivierten Leitfähigkeiten (600-700 pS sowie 1200-1400 pS) und in der Tatsache, daß beide Kanaltypen große Ähnlichkeit aufweisen und sich nur anhand ihrer Leitfähigkeiten unterscheiden. Sie zeigen beide ein extrem langsames Öffnungs- und Schließverhalten, das unabhängig von der angelegten Membranspannung ist, sind schwach kationenselektivität und durch Gd^{3+} inhibierbar.

Obwohl der molekulare Ursprung der mechanosensitive Kanäle in *C. glutamicum* nicht geklärt werden konnte, sprechen die Ergebnisse dafür, daß es sich bei den mechanosensitiven Kanälen in *C. glutamicum* nicht um zwei unterschiedliche Arten von Membranproteinen handelt, sondern um ein und denselben Kanaltyp, der entweder ein kooperatives Öffnungsver-

halten zeigt oder dessen Untereinheiten sich jeweils unterschiedlich in der Membran organisieren.

Der direkte Nachweis der Mitwirkung der mechanosensitiven Kanäle bei dem hypoosmotischen Efflux in *C. glutamicum* konnte nicht erbracht werden. Die exakte Regulation des Efflux auf Aktivitätsebene, die in der exakten mechanosensitiven Aktivierung der Kanäle widergespiegelt wird, liefern jedoch, zusammen mit der beobachteten Ähnlichkeit zu den anderen bakteriellen mechanosensitiven Kanälen, ein starkes Argument dafür, daß die untersuchten mechanosensitive Kanäle für den osmotisch induzierten Efflux in *C. glutamicum* verantwortlich sind.

6. Literatur

Abe, S., K.I. Takayama und S. Kinoshita (1967).

Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria.

J. Gen. Appl. Microbiol. **13**: 279-301.

Ajouz, B., C. Berrier, A. Garrigues, M. Besnard und A. Ghazi (1998).

Release of thioredoxin via the mechanosensitive channel MscL during osmotic downshock of *Escherichia coli* cells.

J. Biol. Chem. **273**: 26670-26674.

Bathe B., J. Kalinowski und A. Pühler (1996).

A physical and genetic map of the *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 chromosome.

Mol. Gen. Genet. **252**: 255-265.

Berrier C., A. Coulombe, C. Houssin und A. Ghazi (1989).

A patch-clamp study of inner and outer membranes and of contact zones of *E. coli*, fused into giant liposomes.

FEBS Lett. **259**: 27-32.

Berrier, G., A. Coulombe, I. Szabo, M. Zoratti und A. Ghazi (1992).

Gadolinium ion inhibits loss of metabolites induced by osmotic shock and large stretch-activated channels in bacteria.

Eur. J. Biochem. **206**: 559-565.

Berrier C., M. Besnard, B. Ajouz, A. Coulombe und A. Ghazi (1996).

Multiple mechanosensitive ion channels from *Escherichia coli*, activated at different thresholds of applied pressure.

J. Memb. Biol. **151**:175-187.

Beutler, H.O. und G. Michal (1974).

L- Glutamatbestimmung mit Glutamat- Dehydrogenase, Diaphorase und Tetrazoliumsalzen.

In: H.U. Bergmeyer (ed.): Methoden der enzymatischen Analyse, Band II.
pp. 1753-1759. Verlag Chemie, Weinheim, Bergstraße.

Birnboim, H.C. und J. Doly (1979).

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.

Nucleic Acids Res. **7**: 1513-1537.

Blount P., S.I. Sukharev, P.C. Moe, M.J. Schroeder, H.R. Guy und C. Kung (1996a).

Membrane topology and multimeric structure of a mechanosensitive channel protein of *Escherichia coli*.

EMBO J. **15**: 4798-4805.

Blount P., S.I. Sukharev, M.J. Schroeder, S.K. Nagle und C. Kung (1996b).

Single residue substitutions that change the gating properties of a mechanosensitive channel in *Escherichia coli*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 11652-11657.

Blount P., S.I. Sukharev, C. Morris, A. Okabe und C. Kung (1996c).

Towards an understanding of the structural and functional properties of MscL, a mechanosensitive channel in bacteria.

Biol. Cell. **87**: 1-8.

Blunden, G., M.M. El Baroundi, S.M. Gordon, W.F.H. McLean und D.J. Rogers (1981).

Extraction, purification and characterisation of Dragendorff- positive compounds from some British marina algae.

Botanica Marina **23**: 451-456.

Bröer, S. und R. Krämer (1990).

Lysine uptake and exchange in *Corynebacterium glutamicum*.

J. Bacteriol. **172**: 7241-7248.

Brown, A.D. und J.R. Simpson (1972).

Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols.

J. Gen. Microbiol. **72**: 589-591.

Brown, A.D., K.F. Mackenzie und K.K. Singh (1986).

Selected aspects of microbial osmoregulation.

FEMS Microbiol. Rev. **39**: 31-36.

Calamita, G., W.R. Bishai, G.M. Preston, W.B. Guggino und P. Agre (1995).

Molecular cloning and characterisation of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli*.

J. Biol. Chem. **270**: 29063-29066.

Caruthers, M.H., A.D. Barone, S.L. Beaucage, D.R. Dodds, E.F. Fisher, L.J. McBride, M.

Matteucci, Z. Stabinski und J.Y. Tang (1987).

Chemical synthesis of desoxynucleotides by the phosphoramidite method.

Meth. Enzymol. **154**: 287-313.

Cayley, S., B.A. Lewis und T.M. Record Jr.(1992).

Origins of the osmoprotective Properties of Betaine and Proline in *Escherichia coli* K-12.

J. Bacteriol. **174**: 1586-1595.

Chrispeels, M.J. und P. Agre (1994).

Aquaporins: Water channel proteins of plant and animal cells.

Trends Biochem. Scien. **19**: 421-425.

Csonka, L.N. (1989).

Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress.

Microbiol. Rev. **53**: 121-147.

Csonka L.N. und A.D. Hanson (1991).

Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology.

Annu. Rev. Microbiol. **45**: 569-606.

Cui C., D.O. Smith und J. Adler (1995).

Characterization of mechanosensitive channels in *Escherichia coli* cytoplasmic membrane by whole-cell patch clamp recording.

J. Membr. Biol. **144**: 31-42.

Dinnbier, U., E. Limpinsel, R. Schmid und E.P. Bakker (1988).

Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations.

Arch. Microbiol. **150**: 348-357.

Ebbighausen, H., B. Weil und R. Krämer (1991).

Carrier-mediated acetate uptake in *Corynebacterium glutamicum*.

Arch. Microbiol. **155**: 505-510.

Farwick, M., R.M. Siewe und R. Krämer (1995).

Glycine betaine uptake after hyperosmotic shift in *Corynebacterium glutamicum*.

J. Bacteriol. **177**: 4690-4695.

Frings, E., H.J. Kunte und E.A. Galinski (1993).

Compatible solutes in representatives of the genera *Brevibacterium* and *Corynebacterium* - Occurrence of tetrahydropyrimidines and glutamine.

FEMS Microbiol. Lett. **109**: 25-32.

Galinski, E.A. und H.G. Trüper (1994).

Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems.
FEMS Microbiol. Rev. **15**: 95-108.

Glaasker, E., W.N. Konings und B. Poolman (1996).

Glycine betaine fluxes in *Lactobacillus plantarum* during osmostasis and hyper- and hypo-osmotic shock.
J. Biol. Chem. **271**: 10060-10065.

Grant, S.G.N., J. Jessee, F.R. Bloom und D. Hanahan (1990).

Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* K-12.
J. Bacteriol. **166**: 253-259.

Gu, L., W. Liu, und B. Martinac (1998).

Electromechanical coupling model of gating the large mechanosensitive ion channel (MscL) of *Escherichia coli* by mechanical force.
Biophys. J. **74**: 1-13.

Guharay, F. und F. Sachs (1984).

Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle.
J. Physiol. (London) **352**: 685-701.

Guillouet, S. und J.M. Engasser (1995a).

Growth of *Corynebacterium glutamicum* in glucose-limited continuous cultures under high osmotic pressure. Influence of growth rate on the intracellular accumulation of proline, glutamate and trehalose.
Appl. Microbiol. Biotechnol. **44**: 496-500.

Guillouet, S. und J.M. Engasser (1995b).

Sodium and proline accumulation in *Corynebacterium glutamicum* as a response to an osmotic saline upshock.
Applied. Microbiol. Biotechnol. **43**: 315-320.

Gutmann, M., C. Hoischen und R. Krämer (1992).

Carrier mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation.
Biochim. Biophys. Acta **1112**: 115-123.

Häse C.C., A.C. Ledain und B. Martinac (1995).

Purification and functional reconstitution of the recombinant large mechanosensitive ion channel (MscL) of *Escherichia coli*.

J. Membr. Biol. **270**: 18329-18334.

Häse C.C., A.C. Ledain und B. Martinac (1997).

Molecular issection of the large mechanosensitive ion channel (MscL) of *E. coli*:

Mutants with altered channel gating and pressure senitivity.

J. Membrane Biol. **157**: 17-25.

Hamill O.P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann und F.J. Sigworth (1981).

Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recordings from cell and cell-free membrane patches.

Pfluegers Arch. **391**: 85-100.

Hamill, O.P. (1983).

Potassium and chloride channels in red blood cells.

In B. Sakmann, E. Neher (eds.): Single-channel recording.

pp. 451-472, Plenum Press, New York and London.

Hamill O.P. und W. McBride Jr. (1996).

The pharmacology of mechanogated membrane ion channels.

Pharma. Reviews **48**: 231-252.

Henzler, T. und E. Steudle (1995).

Reversible closing of water channels in *Chara* internodes provides evidence for a composite transport model of the plasma membrane.

J. Exp. Bot. **46**: 199-209.

Imhoff, J.F. (1986).

Osmoregulation and compatible solutes in eubacteria.

FEMS Microbiol. Rev. **39**: 57-66.

Inoue, H., H. Nojima und H. Okayama (1990).

High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids.

Gene **96**: 23-28.

Jebbar, M., C. Vonblohn und E. Bremer (1992).

Ectoine functions as an osmoprotectant in *Bacillus subtilis* and is accumulated via the abc- transport system OpuC.

FEMS Microbiol. Lett. **154**: 325-330.

Kinoshita, S., S. Ukada und M. Shimono (1957).

Studies on the amino acid fermentation: I. Production of L- glutamic acid by various microorganisms.

J. Gen. Appl. Microbiol. **3**: 192-205.

Klingenberg, M. und E. Pfaff (1967).

Means of terminating reactions.

Methods in Enzymology. **10**: 680-684.

Koo, S.P., C.F. Higgins und I.R Booth (1991).

Regulation of compatible solute accumulation in *Salmonella typhimurium* - Evidence for a glycine betaine efflux system.

J. Gen Microbiol. **137**: 2617-1625.

Krämer, R. (1993).

Mechanismen der Aminosäuresekretion bei *Corynebacterium glutamicum*.

BioEngineering **5**: 51-61.

Krämer, R. (1994).

Secretion of amino acids in bacteria - physiology and mechanism.

FEMS Microbiol. Rev. **13**: 75-93.

Krämer, R., C. Lambert, H. Ebbighausen und C. Hoischen (1990).

Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. I. Kinetic properties and regulation by internal pH and potassium.

Eur. J. Biochem. **194**: 929-935.

Kubalski, A., B. Martinac, K.Y. Ling, J. Adler und C. Kung (1993).

Activities of a mechanosensitive ion channel in an *E. coli* mutant lacking the major lipoprotein.

J. Memb. Biol. **131**: 151-160.

Kung, C., Y. Saimi und B. Martinac (1990).

Mechanosensitive ion channels in microbes and the early evolutionary origin of solvent sensing.

In: Current topics in membranes and transport. pp. 145-153. Academic Press, London.

Lambert, C., A. Erdmann, M. Eikmanns und R. Krämer (1995).

Triggering glutamate excretion in *Corynebacterium glutamicum* by modulating the membrane state by local anaesthetics and osmotic gradients.

Appl. Environ. Microbiol. **61**: 4334-4342.

Lamark, T., O.B. Styrvoid und A.R. Strøm (1992).

Efflux of choline and glycine betaine from osmoregulating cells of *Escherichia coli*.
FEMS Microbiol. Lett. **96**: 149-154.

Landfald, B. und A.R. Strøm (1986).

Choline-glycine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. **165**: 849-855.

Larsen, P.I., L.K. Sydnese, B. Landfald und A.R. Strøm (1987).

Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid and trehalose.
Arch. Microbiol. **147**: 1-7.

Lowry, D.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randall (1951).

Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. **193**: 265-275.

Lindenroth, P. und K. Mopper (1979).

High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolum fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde.
Anal. Chem. **51**: 1667-1674.

Lundin, A., A. Rickardson und A. Thore (1976).

Continuous monitoring of ATP-converting reactions by purified firefly luciferase.
Anal. Biochem. **75**: 611-620.

Martinac, B. (1993).

Mechanosensitive ion channels: Biophysics and physiology.
In M.B. Jackson (ed.): Thermodynamics of membrane receptors and channels.
pp. 327-352, CRC Press, Boca Raton, FL.

Martinac B., M. Buechner, A.H. Delcour, J. Adler und C. Kung (1987).

Pressure-sensitive ion channel in *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**: 2297-2301.

Martinac, B., J. Adler und C. Kung (1990).

Mechanosensitive ion channels of *E. coli* activated by amphipaths.
Nature **348**: 261-263.

Mathai, J.C., S. Mori, B.S. Smith, G.M. Preston, N. Mohandas, M. Collins, P.C.M. Zijl, M.L. Zeidel und P. Agre (1995).

Functional analysis of aquaporine-1 deficient red cells.
J. Biol. Chem. **271**: 1309-1313.

Moe, P.C., P. Blount und C. Kung (1998).

Functional and structural conservation in the mechanosensitive channel MscL implicates elements crucial for mechanosensation.
Molec. Microbiol. **28**: 583-592.

Morris, C. (1990).

Mechanosensitive ion channels.
J. Membr. Biol. **113**: 93-107.

Morris, C.E. (1995).

Stretch-sensitive ion channels.
Cell Physiology Source Book, pp. 483-489.

Niederweis M., E. Maier, T. Lichtinger, R. Benz und R. Kraemer (1995).

Identification of channel-forming activity in the cell wall of *Corynebacterium glutamicum*.
J. Bacteriol. **177**: 5716-5718.

Osborn M.J., J.E. Gander, E. Parisi und J. Carson (1972).

Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*.
J. Biol. Chem. **247**: 3962-3972.

Peter, H. (1997).

Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Aufnahme von osmoprotektiven Substanzen bei *Corynebacterium glutamicum*.
Dissertation, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf.

Peter, H., A. Burkovski und R. Krämer (1996).

Isolation, characterization, and expression of the *Corynebacterium glutamicum betP* gene, encoding the transport system for the compatible solute glycine betaine.
J. Bacteriol. **178**: 5229-5234.

Peter, H., A. Bader, A. Burkovski, C. Lambert und R. Krämer (1997a).

Isolation of the *putP* gene of *Corynebacterium glutamicum* and characterization of a low affinity uptake system for compatible solutes.
Arch. Microbiol. **168**: 143-151.

Peter, H., A. Burkovski und R. Krämer (1997b).

Osmosensing by N- and C- terminal extensions of the glycine betaine uptake system BetP of *Corynebacterium glutamicum*.
J. Biol. Chem. **273**: 2567-2574.

Peters-Wendisch, P.G., V.F. Wendisch, A.A. de Graaf, B.J. Eikmanns und H. Sahm (1996).

C₃-Carboxylation as an anaplerotic reaction in phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient *Corynebacterium glutamicum*.
Arch. Microbiol. **165**: 387-396.

Rottenberg, H. (1979).

The measurement of membrane potential and pH in cells, organelles and vesicles.
Methods Enzymol. **55**: 547-569.

Sachs, F. (1983).

Is the acetylcholine receptor a unit- conductance channel?
In B. Sakmann, E. Neher (eds.): Single-channel recording.
pp. 451-472, Plenum Press, New York and London.

Sackin H. (1995).

Mechanosensitive channels.
Annu. Rev. Physiol. **57**: 333-353.

Saint, N., J.J. Lacapere, L.Q. Gu, A. Ghazi, B. Martinac und J.L. Rigaud (1998).

A hexameric transmembrane pore revealed by two-dimensional crystallization of the large mechanosensitive ion channel (MscL) of *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. **273**: 14557-14670.

Sambrook, J., E.F. Fritsch und T. Maniatis (1989).

Molecular cloning: A laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Sanger, F., S. Nicklen und A.R. Coulson (1977).

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **74**: 5463-5467.

Schimz, K.L., B. Rütten und M. Tretter (1981).

Determination of adenosine nucleotides with luciferin/ luciferase from crude firefly lantern extract on bioluminescence analyser.
Adv. Biotechnol. **1**: 457-462.

Schleyer, M., R. Schmidt und E.P. Bakker (1993).

Transient, specific and extremely rapid release of osmolytes from growing cells of *Escherichia coli* K-12 exposed to hypoosmotic shock.
Arch. Microbiol. **160**: 424-431

Seep-Feldhaus, A.H., J. Kalinowski und A. Pühler (1991).

Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *lysL* gene involved in lysine uptake.
Mol. Microbiol. **5**: 2995-3005.

Skjerdal, O.T., H. Sletta, S.G. Flenstad, K.D. Josefsen, D.W. Levine, und T.E. Ellingsen (1996).

Changes in intracellular composition in response to hyperosmotic stress of NaCl, sucrose or glutamic acid in *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*.
Appl. Microbiol. Biotechnol. **44**: 635-642.

Southern, E.M. (1975).

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. **98**: 503-377.

Styrvold, O.B. und A.R. Strøm (1991).

Synthesis, accumulation, and excretion of trehalose in osmotically stressed *Escherichia coli* K-12 strains: influence of amber suppressors and function of the periplasmic trehalase.
J. Bacteriol. **173**: 1187-1192.

Sukharev S.I., B. Martinac, V.Y. Arshavsky und C. Kung (1993).

Two types of mechanosensitive channels in the *Escherichia coli* cell envelope: Solubilization and functional reconstitution.
Biophys. J. **65**: 177-183.

Sukharev S.I., P. Blount, B. Martinac, F.R. Blattner und C. Kung (1994).

A large-conductance mechanosensitive channel in *E. coli* encoded by *mscL* alone.
Nature **368**: 265-268.

Sukharev S.I., P. Blount, B. Martinac und C. Kung (1997).

Mechanosensitive channels of *Escherichia coli*: The MscL gene, protein and activities.
Annu. Rev. Physiol. **59**: 633-657.

Szabó I., V. Petronilli und M. Zoratti (1992).

A patch-clamp study of *Bacillus subtilis*.
 Biochim. Biophys. Acta **00**: 1-10.

Tsapis, A. und Kepes, A. (1977).

Transient breakdown of permeability barrier of the membrane of *Escherichia coli* upon osmotic shock.
 Biochim. Biophys. Acta **469**: 1-12.

Vieira, J. und J. Messing (1982).

The pUC plasmids, an M13mp7 - derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers.
 Gene **19**: 259-268.

Yang, X.C. und F. Sachs (1989).

Block of stretch-activated ion channels in *Xenopus* oocytes by gadolinium and calcium ions.
 Science **243**: 1068-1071.

Zaritsky, A., M. Kihara und R.M. Macnab (1981).

Measurement of membrane potential in *Bacillus subtilis*: a comparison of lipophilic cations, rubidium ion, and a cyanine dye as probes.
 J. Membr. Biol. **63**: 215-231.

Zimmermann, J., H. Voss, C. Schwager, J. Stegemann, H. Erfle, K. Stucky, T.

Kristensen, und W. Ansorge (1990).
 A simplified protocol for fast plasmid DNA sequencing.
 Nucleic Acids Res. **18**: 1067.

Zittrich, S. und R. Krämer (1994).

Quantitative discrimination of carrier mediated excretion of isoleucine from uptake and diffusion in *Corynebacterium glutamicum*:
 J. Bacteriol. **76**: 6892-6899.

Zoratti M. und V. Petronilli (1988).

Ion-conducting channels in a Gram-positive bacterium.
 FEBS Lett. **240**: 105-109.

Zoratti M., V. Petronilli und I. Szabo (1990).

Stretch-activated composite ion channels in *Bacillus subtilis*.
 Bioch. Biophys. Res. Comm. **168**: 442-450.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Krämer für die Überlassung des Themas, für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für die engagierte Betreuung sowie die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und die zahlreichen wertvollen Ratschläge.

Frau PD. Dr. Sabine Waffenschmidt danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Sahm bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Biotechnologie des Forschungszentrums Jülich und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Alexandre Ghazi und Dr. Catherine Berrier für die gute Betreuung der elektrophysiologischen Arbeiten, die vielen guten Tips und Diskussionen. Mein Dank gilt allen Mitarbeitern am Institut für Biomembranen der Universität Paris für ihre freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft, ganz besonders bedanken möchte ich mich aber bei Dr. Lucienne Letellier und Zahia Amiar für ihren moralischen und organisatorischen Beistand. Merci!

Monsieur Lambert danke ich für die Einführung in das biochemische Arbeiten sowie die gute Zusammenarbeit. Sind wir nicht alle „die Aff mit die Kapp auf“?

Für die Betreuung und Unterstützung der molekularbiologischen Arbeiten möchte ich mich bei Dr. Marc Jakoby, Dr. Andreas Burkovski und Dr. Susanne Morbach bedanken!

Dr. Volker Wendisch danke ich für die Unterstützung bei der [^1H]-NMR-Analytik.

Bei meinen Labor- und Bürokollegen aus Jülich und Köln und bei allen weiteren Angehörigen des Instituts für Biotechnologie I / Biochemie und den Werkstätten möchte ich mich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit, die Hilfe in verschiedensten Situationen, das gute Arbeitsklima sowie für die nette Zeit außerhalb des Labors bedanken.

Voller Dankbarkeit gedenke ich auch Inna Tikhonova, deren Bekanntschaft mir viel bedeutet hat.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, und allen, die mich in den letzten 3 Jahren ertragen mußten, für ihre Unterstützung und ihr Verständnis.

Forschungszentrum Jülich



Jül-3621
Januar 1999
ISSN 0944-2952