

**Untersuchungen zu Mechanismen der  
Stressantwort und des Kaliumtransportes in  
*Corynebacterium glutamicum***

**Inaugural-Dissertation**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Ines Ochrombel**

aus Bergheim

**Köln**

**2011**

Berichtersteller:

Prof. Dr. Reinhard Krämer

Prof. Dr. Arnd Baumann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.04.2011

***„Aber man verlangt vom Forscher, dass er Beweise liefert,  
wenn es sich zum Beispiel um die Entdeckung eines großen Berges handelt,  
verlangt man, dass er große Steine mitbringt.“***

*Antoine de Saint-Exupéry, Le petit prince (1943)*

### **Kurzzusammenfassung**

Die Stressantwort von *Corynebacterium glutamicum* auf verschiedene abiotische Faktoren wurde physiologisch und biochemisch untersucht. Bei tiefen externen pH-Werten und unter hyperosmotischen Bedingungen ist Kalium für das optimale Wachstum von *C. glutamicum* essentiell. Bei niedrigen pH-Werten kommt es durch die endogene Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu oxidativem Stress, und die Limitation der Aktivität der Cystathionin-β-Lyase führt zu einer Störung der Thiolhomöostase, was das Wachstum der Zellen einschränkt. Kalium ist unter sauren Bedingungen für die Stimulation der Atmungskettenaktivität essentiell. Unter hyperosmotischen Bedingungen wird Kalium in großen Mengen intern akkumuliert, wo es essentiell zum Pool der Osmolyte beiträgt. Kalium ist dabei für die induzierte osmoregulierte Expression der Gene *betP* und *proP* notwendig.

Der kaliumspezifische Kanal CgIK fungiert in *C. glutamicum* sowohl bei niedrigen pH-Werten, als auch bei Osmostress als Hauptaufnahmesystem für Kalium, während der putative sekundär aktive Kup-Transporter keine Funktion hat. Die mRNA von *cglK* wird in ein membranintegriertes CgIK-Protein und zusätzlich in ein cytoplasmatisches KTN-Protein translatiert. Die Analyse der Funktion von CgIK wurde in *C. glutamicum*- und *E. coli*-Zellen durchgeführt, wobei in Proteoliposomen und in *E. coli*-Sphäroplasten elektrophysiologische Untersuchungen möglich waren. Die C-terminalen KTN-Domänen von CgIK sind für dessen Schließung essentiell, während die separaten KTN-Proteine an der vollständigen Öffnung und möglicherweise an einer pH-Wert abhängigen Regulation des Kanals beteiligt sind.

Die Kaliumaufnahme über den CgIK-Kanal ist für *C. glutamicum* unter habitatähnlichen Bedingungen für das Wachstum und die Aminosäureproduktion ausreichend. Unter extremen Stressbedingungen in Verbindung mit einer Kaliumlimitation hat die heterologe Expression eines aktiven Kaliumtransporters einen positiven Effekt auf die Stressresistenz der *C. glutamicum*-Zellen.

## Abstract

The response towards abiotic stress of *Corynebacterium glutamicum* was examined on a physiological and biochemical level. Acidic conditions cause oxidative stress by increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels. The limited activity of the cystathionine- $\beta$ -lyase AecD impairs thiol homeostasis, resulting in reduced cell growth. Potassium is required for stimulating respiratory chain activity at low pH. Under hyperosmotic conditions high potassium concentrations are intracellularly accumulated contributing to the total osmolyte pool. Potassium is also essential for induction of the osmoregulated genes *betP* and *proP*.

In *C. glutamicum* the potassium channel CgIK is the main uptake system for potassium at low pH values, as well as under osmotic stress. The putative secondary transporter Kup has no function. The mRNA of *cglK* is translated as a membrane-integrated protein and, additionally, as a cytoplasmic KTN-protein. Potassium translocation activity of CgIK was shown *in vivo* by complementation of potassium deficient *C. glutamicum* and *E. coli* cells. Furthermore, CgIK functionality was shown *in vitro* by electrophysiological measurements of proteoliposomes and *E. coli* spheroplasts, containing the channel protein. The C-terminal KTN domains of CgIK are essential for channel closing, whereas the separate KTN proteins are involved in full opening and probably in pH dependent channel regulation.

Under conditions similar to the natural habitat of *C. glutamicum*, potassium uptake *via* the CgIK channel is sufficient for growth and amino acid production. Under conditions of extreme stress, combined with potassium deficiency, the heterologous expression of an active potassium KtrAB transporter has a beneficial effect on stress resistance of *C. glutamicum* cells.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Bedeutung von Kalium in der bakteriellen Stressanpassung.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Bakterielle Anpassung an niedrige externe pH-Werte .....	2
1.1.2	Bakterielle Anpassung an hyperosmotische Bedingungen .....	5
<b>1.2</b>	<b>Transport von Kalium .....</b>	<b>7</b>
1.2.1	Kaliumkanäle .....	7
1.2.1.1	Struktur und Funktion .....	7
1.2.1.2	Permeation und <i>gating</i> -Mechanismen .....	9
1.2.2	Proteinsequenzvergleich von CgIK aus <i>C. glutamicum</i> mit MthK aus <i>M. thermoautotrophicum</i> .....	11
1.2.3	Kaliumtransporter .....	12
<b>1.3</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Organismen.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Plasmide.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3</b>	<b>Oligonukleotide.....</b>	<b>18</b>
<b>2.4</b>	<b>Nährmedien und Kultivierungsbedingungen .....</b>	<b>19</b>
2.4.1	Komplexmedien für <i>E. coli</i> .....	19
2.4.2	Komplexmedien für <i>C. glutamicum</i> .....	20
2.4.3	Minimalmedium für <i>E. coli</i> .....	20
2.4.3.1	K <sub>x</sub> -Medium .....	20
2.4.3.2	K <sub>x</sub> -Agarplatten .....	21
2.4.3.3	Wachstumssupplemente.....	21
2.4.4	Minimalmedien (MMI) für <i>C. glutamicum</i> .....	21
2.4.5	Antibiotika und IPTG .....	22
<b>2.5</b>	<b>Kultivierungsbedingungen .....</b>	<b>22</b>
2.5.1	Stammhaltung und Vorkulturen .....	22
2.5.2	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	22
2.5.3	Kultivierung von <i>C. glutamicum</i> .....	23
2.5.4	Kultivierung in Mikrotiterplatten.....	24
2.5.5	Batch-Fermentation im Bioreaktor .....	24
<b>2.6</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>25</b>
2.6.1	Präparation chromosomaler DNA aus <i>C. glutamicum</i> .....	25
2.6.2	Konzentrationsbestimmung der DNA.....	25
2.6.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	26
2.6.4	Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	26
2.6.5	Plasmidpräparation .....	26
2.6.6	Ligation und Spaltung von Plasmiden und PCR-Fragmenten .....	27
2.6.7	Ortsgerichtete Mutagenese.....	27
2.6.8	DNA-Sequenzanalyse .....	27
2.6.9	Transformation von <i>E. coli</i> .....	28
2.6.9.1	Hitzeschock .....	28
2.6.9.2	Variation CaCl <sub>2</sub> Hitze-Schock.....	28
2.6.10	Transformation von <i>C. glutamicum</i> .....	28
2.6.11	Blau-Weiß-Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> -Klone.....	29
2.6.12	Konstruktion von Insertionsmutanten .....	29

# Inhaltsverzeichnis

<b>2.7</b>	<b>Biochemische Techniken.....</b>	<b>30</b>
2.7.1	Bestimmung der internen und externen Kaliumkonzentration .....	30
2.7.2	Messung der Kaliumaufnahme (Institute Of Medical Sciences, IMS Aberdeen) .....	30
2.7.3	Bestimmung der internen Calciumkonzentration in <i>C. glutamicum</i> .....	31
2.7.4	Membranpotential Messungen von <i>E. coli</i> .....	31
2.7.5	Bestimmung des cytoplasmatischen pH-Wertes von <i>C. glutamicum</i> .....	32
2.7.6	Bestimmung des Membranpotentials von <i>C. glutamicum</i> .....	33
2.7.7	Bestimmung der protonenmotorischen Kraft (PMK) von <i>C. glutamicum</i> .....	34
2.7.8	Bestimmung der Atmungsaktivität .....	34
2.7.9	HPLC-Analyse zur Bestimmung von L-Lysin und L-Glutamat .....	35
2.7.10	RNA-Isolierung und -Hybridisierung (Northern Blot).....	35
<b>2.8</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>36</b>
2.8.1	Proteinsynthese.....	36
2.8.2	Proteinextraktion .....	36
2.8.3	Membranpräparation.....	37
2.8.4	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	37
2.8.5	Eindimensionale Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	38
2.8.6	Coomassie-Färbung .....	38
2.8.7	Transfer, Immobilisierung und Nachweis von Proteinen (Western Blot).....	38
2.8.8	Blue-Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Blue-Native-PAGE).....	39
2.8.9	Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Native-PAGE) .....	39
2.8.10	Katalase-Nachweis .....	39
2.8.11	Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie .....	40
2.8.12	Identifizierung von Proteinen .....	40
2.8.13	Analytische Gelfiltration mittels Ausschlusschromatographie .....	40
2.8.14	Heterologe Expression von <i>cglK</i> und <i>cglK_M1371</i> .....	41
2.8.15	Solubilisierung und Aufreinigung von CgIK.....	41
2.8.16	Rekonstitution von CgIK (Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg, ZmnH Hamburg).....	41
2.8.17	<i>In vivo</i> -Lokalisierung des GFP-CgIK-Proteins in <i>C. glutamicum</i> .....	42
<b>2.9</b>	<b>Elektrophysiologische Messungen .....</b>	<b>42</b>
2.9.1	Die <i>Patch-Clamp</i> -Technik .....	42
2.9.2	<i>Patch-Clamp</i> -Messungen von Proteoliposomen (ZmnH Hamburg) .....	43
2.9.3	Isolierte <i>Patch-Clamp</i> -Messungen von <i>E. coli</i> -Sphäroplasten (IMS Aberdeen) .....	44
2.9.3.1	Sphäroplasten-Präparation .....	44
2.9.4	<i>Patch-Clamp</i> Messungen von <i>E. coli</i> -Sphäroplasten .....	45
2.9.5	Bestimmung der Einzelkanalleitfähigkeit von CgIK.....	46
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>47</b>
<b>3.1</b>	<b>Auswirkungen von pH-Stress auf den Stoffwechsel von <i>C. glutamicum</i> und Bedeutung der Kaliumaufnahme .....</b>	<b>47</b>
3.1.1	Die externe Zugabe von Cystein verstärkt die pH-Sensitivität im sauren Bereich.....	47
3.1.2	Bei neutralem und tiefem pH wird endogen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> produziert.....	48
3.1.3	Kaliumaufnahme beeinflusst die Atmungsaktivität bei tiefem pH .....	49
<b>3.2</b>	<b>Bedeutung von Kalium unter hyperosmotischen Bedingungen .....</b>	<b>51</b>
3.2.1	Kaliumabhängiges Wachstum von <i>C. glutamicum</i> unter hyperosmotischen Bedingungen.....	51
3.2.2	Die Akkumulation von Kalium bei osmotischem Stress geht nicht mit einer Glutamatakkumulation einher .....	52
3.2.3	Kaliumabhängige Induktion der Expression von <i>betP</i> und <i>proP</i> nach Erhöhung der externen Salzkonzentration .....	53
3.2.4	CgIK ist unter hyperosmotischen Bedingungen essentiell .....	54
<b>3.3</b>	<b>Untersuchungen zum Aufbau von CgIK aus <i>C. glutamicum</i> .....</b>	<b>55</b>
3.3.1	Funktionelle Expression von <i>cglK</i> in <i>C. glutamicum</i> .....	55
3.3.2	Die mRNA von <i>cglK</i> wird auch in <i>E. coli</i> in ein CgIK- und ein separates KTN-Protein translatiert..	56
3.3.3	Solubiliertes CgIK-Protein bildet membranintegrierte Oligomere .....	57

# Inhaltsverzeichnis

<b>3.4</b>	<b>Die KTN-abhängige Funktion von CgIK in <i>C. glutamicum</i> und <i>E. coli</i></b> ..... 58
3.4.1	Der Verlust der separaten KTN-Proteine schränkt das Wachstum von <i>C. glutamicum</i> bei tiefem pH-Wert ein ..... 58
3.4.2	Konstruktion und Expression von <i>cglK</i> und -Varianten im <i>E. coli</i> Stamm TK2309..... 60
3.4.3	Einfluss der heterologen Expression von <i>cglK</i> und <i>cglK</i> -Varianten auf das Wachstum von <i>E. coli</i> TK2309 ..... 61
3.4.4	Kaliumaufnahmemessungen mit CgIK- und -Varianten in <i>E. coli</i> TK2309..... 65
3.4.5	Einfluss der Kaliumaufnahme auf das Membranpotential von <i>E. coli</i> -Zellen ..... 66
<b>3.5</b>	<b>Untersuchung der Einzelkanalaktivität von CgIK</b> ..... 68
3.5.1	Elektrophysiologische Untersuchungen von CgIK in Proteoliposomen (ZmNH Hamburg) ..... 68
3.5.2	Elektrophysiologische Untersuchungen von CgIK an <i>E. coli</i> -Sphäroplasten (IMS Aberdeen) ..... 69
3.5.3	Elektrophysiologische Untersuchungen von CgIK mit veränderter Anzahl an KTN-Modulen ..... 71
<b>3.6</b>	<b>Biochemische Charakterisierung von KTN-Modifikationen und deren Einfluss unter <i>in vivo</i> Bedingungen</b> ..... 74
3.6.1	Analyse der Oligomerisierung der KTN-Proteine in Abhängigkeit vom pH-Wert..... 74
3.6.2	Untersuchungen zur pH-sensorischen Funktion von KTN..... 76
3.6.3	Untersuchungen zur Bedeutung des Nukleotid-Bindemotives in KTN..... 78
<b>3.7</b>	<b>Einfluss von Kanal- und Transporter-vermittelter Kaliumaufnahme auf die Stressanpassung von <i>C. glutamicum</i></b> ..... 81
3.7.1	Heterologe Expression von <i>ctrBA</i> aus <i>C. jeikeium</i> in <i>C. glutamicum</i> ..... 81
3.7.2	Einfluss des heterologen KtrAB-Transporters auf die pH-Homöostase von <i>C. glutamicum</i> ..... 83
3.7.3	Einfluss des heterologen KtrAB-Transporters auf die Osmostressantwort von <i>C. glutamicum</i> ..... 88
3.7.4	Auswirkungen von KtrBA auf die Lysinproduktion durch <i>C. glutamicum</i> ..... 90
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> ..... 91
<b>4.1</b>	<b>Die Sensitivität von <i>C. glutamicum</i> gegenüber tiefen pH-Werten wird durch eine Störung der Thiolhomöostase beeinflusst</b> ..... 91
<b>4.2</b>	<b>Bei tiefen pH-Werten kommt es durch die endogene Entstehung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu oxidativem Stress</b> ..... 92
<b>4.3</b>	<b>Unter Säurestressbedingungen ist die kaliumabhängige Stimulation der Atmungskettenaktivität für die Bioenergetik von <i>C. glutamicum</i> wichtig</b> ..... 93
<b>4.4</b>	<b>Bei osmotischem Stress reguliert die CgIK-vermittelte Kaliumakkumulation als indirektes Signal die Akklimatisation von <i>C. glutamicum</i></b> ..... 94
<b>4.5</b>	<b>Der CgIK-Komplex aus <i>C. glutamicum</i> ist ein kaliumspezifischer Kanal</b> ..... 96
<b>4.6</b>	<b>Die KTN-Module sind essentiell am <i>gating</i> von CgIK beteiligt</b> ..... 98
<b>4.7</b>	<b>Sowohl <i>C. glutamicum</i>, als auch <i>E. coli</i>-Zellen können in Abwesenheit der KTN-Module nur bedingt Kalium durch CgIK aufnehmen</b> ..... 100
<b>4.8</b>	<b>Modell zum <i>gating</i>-Mechanismus von CgIK</b> ..... 103
<b>4.9</b>	<b>Die Kaliumversorgung durch den CgIK-Kanal ist für <i>C. glutamicum</i> ausreichend, wird jedoch unter kaliumlimitierenden Stressbedingungen durch einen aktiven Kaliumtransporter verbessert</b> ..... 104
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> ..... 107
<b>6</b>	<b>ANHANG</b> ..... 109
<b>6.1</b>	<b>Peptide Mass Fingerprints der aufgereinigten Proteine der <i>cglK</i>-Expression</b> ..... 109

## Inhaltsverzeichnis

---

6.2	Bestimmung der internen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in <i>C. glutamicum</i> .....	109
6.3	SDS-PAGE und Western Blot der in den Messungen des Membranpotentials verwendeten Zellen.....	110
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	111

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
<i>ad</i>	auf, bis (hinzufügen)
Amp <sup>r</sup>	Resistenz gegen Ampicillin
BHI	Brain-Heart-Infusion
bp	Basenpaare
BTM	Biotrockenmasse
Carb <sup>r</sup>	Resistenz gegen Carbenicillin
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
DDM	<i>n-Dodecyl</i> - $\beta$ -maltosid
DM	<i>n-Decyl</i> - $\beta$ -maltosid
dpm	Zerfälle pro Minute
GFP	grün fluoreszierendes Protein
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
IPTG	Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Km <sup>r</sup>	Resistenz gegen Kanamycin
MTP	Mikrotiterplatten
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid
n	Anzahl der Replikate
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(-phosphat)
NBT	p-Nitrotetrazoliumblauschwarz
OD <sub>600</sub> ; OD <sub>650</sub>	optische Dichte (gemessen bei 600 oder 650 nm)
pH <sub>ex; in</sub>	externer; interner pH-Wert
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprint</i>
PMK	protonenmotorische Kraft
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
TM	Transmembrandomäne
$\Delta\Psi$	Membranpotential
$\Delta$ pH	pH-Gradient

Weiterhin wurden die üblichen Abkürzungen des Internationalen Einheitensystems verwendet

### 1 Einleitung

Bakterien, die nahezu alle Habitate der Erde besiedeln, sind häufig schwankenden Umweltbedingungen ausgesetzt. Daher besitzen sie vielfältige und koordinierte Regulationsmechanismen, um auf veränderte Umweltparameter zu reagieren und eine innere Homöostase der Zelle zu gewährleisten. Als einer der bedeutendsten Mikroorganismen bei der biotechnologischen Herstellung von Aminosäuren gilt das Gram-positive Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum*. Die Zuordnung zu den Corynebakterien ist auf das keulenförmige Aussehen (*coryne* = Keule) zurückzuführen, wobei es sich bei *C. glutamicum* um ein nicht-pathogenes, unbewegliches und nicht-sporulierendes Bakterium handelt. Zusammen mit den pathogenen Stämmen *C. diphtheriae*, *C. jeikeium*, *Mycobacterium tuberculosis* und *M. leprae* wird *C. glutamicum* den mycolsäurehaltigen Actinomyceten zugeordnet (Minnikin, 1982; Stackebrandt *et al.*, 1997). Seit seiner Entdeckung als natürlicher Glutamat-Produzent im Jahre 1957 (Abe *et al.*, 1967) hat *C. glutamicum* weltweite Bedeutung für die fermentative Produktion von L-Glutamat und L-Lysin im industriellen Maßstab erlangt (Leuchtenberger *et al.*, 2005). Absatz finden diese Produkte sowohl in der Nahrungsmittel-, als auch in der Futtermittelindustrie. Im natürlichen Habitat, aber auch während der Produktfermentation sind die Zellen unterschiedlichen Stressfaktoren, wie lokal schwankenden externen pH-Werten und hohen externen Osmolalitäten ausgesetzt, die die intrazellulären Bedingungen verändern und daher die Produktionsrate beeinflussen können. Das Verständnis der unterschiedlichen Stressantworten von *C. glutamicum* mit den dazugehörigen zellulären Mechanismen ist daher von biotechnologischem Interesse für die Produktion, kann aber auch modellartige Erkenntnisse für die wesentlich aufwendiger zu untersuchenden, verwandten Humanpathogene liefern.

#### 1.1 Bedeutung von Kalium in der bakteriellen Stressanpassung

Obwohl Metallionen, wie Kalium, Natrium, Magnesium und Calcium nur einen geringen prozentualen Anteil der Trockenmasse der Zelle darstellen, sind sie für viele zelluläre Prozesse essentiell. Kalium ist das zweithäufigste alkalische Kation in der Natur und stellt in bakteriellen Zellen das Hauptkation dar, wobei es auch als Hauptosmolyt fungiert (Stumpe *et al.*, 1996). Die Kaliumkonzentration beträgt in den meisten Bakterien mehrere hundert Millimolar, während die zellulären Makromoleküle an den Zustand des hohen Kaliumgehaltes adaptiert sind, und auch von höheren Kaliumkonzentrationen nur geringfügig

beeinträchtigt werden (Kuo *et al.*, 2005). In Prokaryoten übernimmt Kalium unterschiedliche Aufgaben, unter anderem fungiert es als osmotisches Solut im Rahmen der Regulation des Zellvolumens und ist für die Regulation des internen pH-Wertes essentiell (Booth, 1985; Epstein, 2003). Dabei übernimmt Kalium eine essentielle Funktion als sekundärer Messenger bei der Aktivierung von intrazellulären Enzymen (Suelter, 1970). Desweiteren befindet sich jeweils im aktiven Zentrum der Ribosomen ein Kaliumion (Nissen *et al.*, 2000). Wozu neben der allgemeinen Bedeutung von Kalium in der Zelle ein erhöhter Bedarf bei unterschiedlichen Stressbedingungen ausgelöst wird, ist weitgehend ungeklärt.

### 1.1.1 Bakterielle Anpassung an niedrige externe pH-Werte

Ein für das bakterielle Leben in einem bestimmten Milieu entscheidender Parameter ist der externe pH-Wert, der den Zellstoffwechsel, aber auch die Löslichkeit von Nährstoffen und Spurenelementen beeinflusst. Die Fähigkeit eines Organismus seinen internen pH-Wert unabhängig von Schwankungen des externen pH-Wertes auf einem konstanten Niveau zu halten, wird als pH-Homöostase bezeichnet und ist entscheidend für die Funktionalität und Stabilität der zellulären Enzyme. Der interne pH-Wert der meisten Bakterien ist neutral bis leicht alkalisch (Booth, 1985). In *E. coli*-Zellen wird der interne pH-Wert bei externen pH-Werten von 5 bis 9 zwischen 7,4 und 7,8 aufrechterhalten (Slonczewski und Foster, 1996). Der Bereich der pH-Homöostase von *C. glutamicum* ist hingegen kleiner, bei externen pH-Werten zwischen 6 und 9 betragen die internen pH-Werte 7 bis 8,3 (Follmann *et al.*, 2009b). Zu den generellen Mechanismen, die zur Anpassung von Bakterien an niedrige externe pH-Werte zählen, gehören die protonenundurchlässige Cytoplasmamembran und die Pufferkapazität des Cytoplasmas (Booth, 1985). Diese Pufferkapazität wird durch Nukleinsäuren und den Aminosäureseitenketten der Proteine bedingt, die bei einem internen pH-Wert von 7,0 50-100 nmol H<sup>+</sup> pro pH-Einheit und mg Zellprotein beträgt. Desweiteren werden in Reaktion auf Säurestress in bakteriellen Zellen die Chaperon- und DNA-Reparatur-Aktivität, sowie der Protonenexport zum Schutz wichtiger zellulärer Komponenten, erhöht (Cotter und Hill, 2003). Umfassende Genom- und Transkriptomanalysen von bei niedrigem, im Vergleich zu neutralem pH-Wert kultivierten *C. glutamicum*-Zellen zeigten für eine Vielzahl von Genen einen veränderten mRNA-Gehalt, deren codierte Proteine ebenfalls in abweichender Peptidanzahl vorkamen (Follmann *et al.*, 2009b). Unter Säurestressbedingungen wurde in *C. glutamicum* während der Langzeitanpassung an Laktat die Induktion der Eisenaufnahme detektiert (Jakob *et al.*, 2007). In anderen bakteriellen Organismen konnten unter anderem die sekundäre Entstehung von oxidativem Stress

(Fisher *et al.*, 2002), oder eine limitierende Methioninbiosynthese in den Zusammenhang mit eingeschränktem Wachstum bei tiefen pH-Werten gebracht werden (Roe *et al.*, 2002). Inwiefern diese Faktoren möglicherweise ebenfalls an der pH-Stressantwort von *C. glutamicum* beteiligt sind, ist bisher nicht untersucht worden.

Bei niedrigen externen pH-Werten ist Kalium für das Wachstum von *C. glutamicum* essentiell, wobei das Protein CgIK das Hauptaufnahmesystem für Kalium darstellt (Follmann *et al.*, 2009a). Wie *E. coli*- können auch *C. glutamicum*-Zellen ohne Kalium ihren internen pH-Wert bei niedrigen externen pH-Werten nicht aufrechterhalten (Booth und Kroll, 1983; Follmann *et al.*, 2009a). In *E. coli* wird auch bei externen Kaliumkonzentrationen von weniger als 1  $\mu\text{M}$  ein interner Kaliumgehalt von über 100 mM stabilisiert, während er ansonsten 100 bis 500 mM beträgt (Solomon und Schultz, 1961). In *C. glutamicum* können hingegen stark schwankende interne Kaliumkonzentrationen auftreten. Während unter leicht alkalischen pH-Bedingungen *C. glutamicum* in Abwesenheit von Kalium mit zellulären Kaliumgehalten von unter 20 mM wachsen kann (Follmann *et al.*, 2009a), liegt der interne Gehalt bei ausreichender Kaliumversorgung zwischen 300 und 800 mM (Krämer *et al.*, 1990). Der genaue Mechanismus der kaliumvermittelten Säuretoleranz ist noch ungeklärt. Unter neutralen pH-Bedingungen liegt in *C. glutamicum* ein geringer chemischer Protonengradient ( $\Delta\text{pH}$ ) über der Membran vor, und der Wert der Protonenmotorischen Kraft (PMK) wird von einem relativ großen, elektrischen Membranpotential ( $\Delta\Psi$ ) bestimmt (Gleichung 1).

$$\Delta\mu_{\text{ion}} = n * F * \Delta\Psi + 2,3 R * T * \log [X]_{\text{A}} / [X]_{\text{B}} \quad (\text{Elektrochemisches Ionenpotential})$$

$$\text{PMK} = \Delta\mu_{\text{H}^+} * F^{-1} = \Delta\Psi - 2,3 R * T * F^{-1} * \Delta\text{pH} \quad (\text{Protonenmotorische Kraft})$$

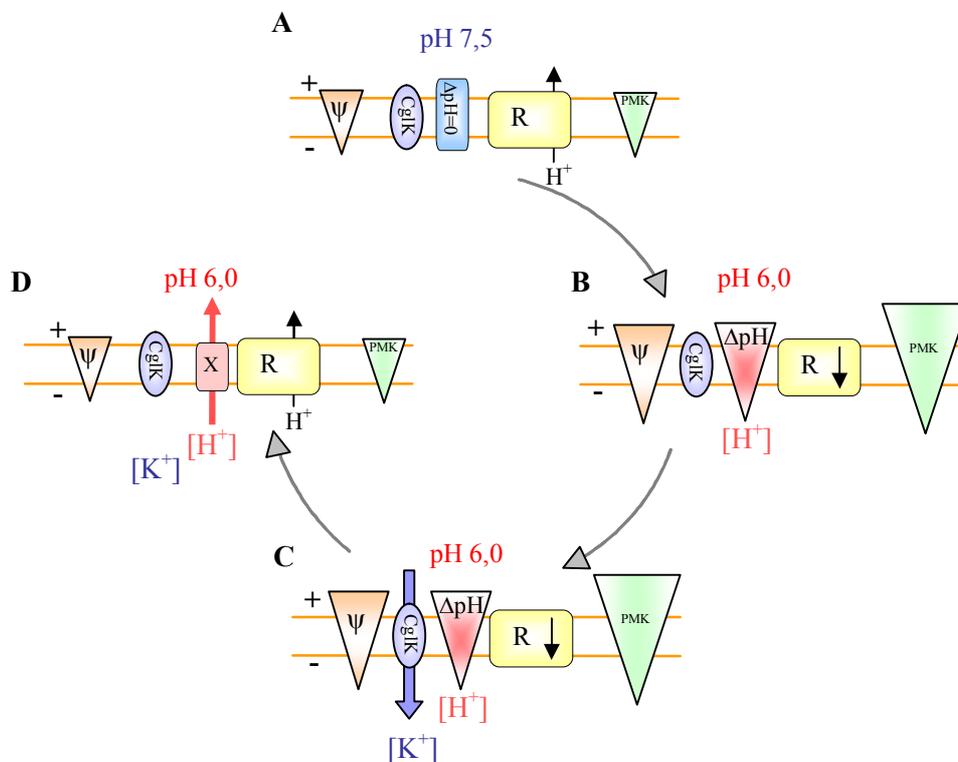
$\Delta\Psi$  = Membranpotential (mV);    R = allgemeine Gaskonstante

F = Faraday'sche Konstante;    n = Elektronenanzahl;    X = Konzentration

A, B = Kompartimente ;    T = Temperatur (K) (Gleichung 1)

Durch eine regulierte Anpassung des Membranpotentials kann *C. glutamicum* die PMK, die essentiell für die Generierung von ATP über die  $F_1F_0$ -ATPase ist (Boyer *et al.*, 1973), mit Werten zwischen 150 und 200 mV, über einen großen pH-Bereich von pH 4,5 bis 11 konstant halten (Follmann *et al.*, 2009b). Wie diese Regulation stattfindet ist im Folgenden modellartig zusammengefasst. Sinkt der externe pH-Wert, so erhöht sich die Protonenkonzentration im Medium und mit dem entstehenden Protonengradienten über der Membran wird der Wert der PMK erhöht, was zur Einschränkung der Atmungskettenaktivität führt (Löffler *et al.*, 2007) (Abb. 1.1A-B).

Ein vermehrtes Eindringen von Protonen ins Cytoplasma, was zur Aufhebung des Protonengradientens führt, würde weitere metabolische Prozesse der Zelle beeinflussen. Strömen Kaliumionen durch CgIK in die Zelle, kommt es zu einer Verschiebung positiver Ladungen, was mit einem Abfall des Membranpotentials einhergeht und den Wert der PMK erniedrigt (Abb. 1.1C). Die Einschränkung der Atmungskettenaktivität wird somit wieder aufgehoben, und durch einen verstärkten Protonenexport durch bisher unbekannte Systeme wird der pH-Wert im Cytoplasma reguliert (Abb. 1.1D). Welchen Effekt der Kaliumstrom auf die Aktivität der Atmungskette unter tiefen pH-Wert Bedingungen hat, und wie die kaliumvermittelte pH-Homöostase mechanistisch abläuft, ist bisher ungeklärt.



**Abb. 1.1: Modell zur bioenergetischen Funktion von Kalium in der pH-Homöostase von *C. glutamicum*.** Unter neutralen pH-Bedingungen bei  $pH_{in} = pH_{ex} = 7,5$  wird die Protonenmotorische Kraft (PMK) ausschließlich vom Wert des Membranpotentials ( $\Delta\Psi$ ) bestimmt, während die Atmungskette (R) uneingeschränkt aktiv ↑ ist (A). Sinkt der externe pH auf 6,0 ab, so entsteht ein Protonengradient ( $\Delta pH$ ) über der Membran, der einen höheren Wert der PMK bedingt. Aufgrund der erhöhten PMK ist auch die Atmungskette (R) nur eingeschränkt aktiv ↓ und es können Protonen in die Zelle gelangen (B). Der Einstrom von Kaliumionen durch CgIK ins Cytoplasma führt aufgrund der Verschiebung positiver Ladungen zur Absenkung von  $\Delta\Psi$  (C). Somit wird auch die PMK erniedrigt, so dass die Atmungskette wieder uneingeschränkt aktiv ist, und protonenexportierende Systeme (X) den pH-Wert in der Zelle regulieren können (D).

### 1.1.2 Bakterielle Anpassung an hyperosmotische Bedingungen

Der Effekt von Änderungen der umgebenden Osmolalität auf die bakterielle Zelle beruht auf der selektiven Permeabilität ihrer Cytoplasmamembran, die impermeabel für Makromoleküle, Ionen und polare Substanzen, aber durchlässig für Wasser ist (Bremer und Krämer, 2000). Da die Konzentration osmotisch aktiver Substanzen normalerweise im Cytoplasma deutlich höher als im Medium ist, liegt ein positiver Turgordruck, der als hydrostatischer Druck über der Zellmembran definiert ist, in der Zelle vor. Ein Anstieg der externen Osmolalität wird als hyperosmotischer Stress bezeichnet, wenn er mit dem Absinken des Zellurgors einhergeht. Eine strikte Regulation dieses Turgors ist für die Bakterienzelle essentiell, da seine mechanische Kraft Voraussetzung für das Zellwachstum und die Zellteilung ist (Koch, 1983). Ein osmotischer Wasserausstrom gefährdet das Leben der Zelle, aufgrund drohender Austrocknung (Wood, 1999). In der ersten Phase der Osmoadaptation von *E. coli* kommt es zur schnellen Aufnahme von Kaliumionen, wodurch der Wasserverlust gestoppt werden soll (Epstein, 1986).

In *E. coli* wird dieser Kaliumstrom durch ein niederaffines Trk- und ein hochaffines Kdp-System vermittelt (Bremer und Krämer, 2000), während dafür in *B. subtilis* Ktr-Systeme verantwortlich sind (Holtmann *et al.*, 2003). In *C. glutamicum* ist das System, das die Aufnahme von Kalium unter hyperosmotischen Bedingungen vermittelt, bisher nicht identifiziert. Die intrazelluläre Kaliumkonzentration steigt in *E. coli* bei externen Osmolalitäten von 0,4 bis 1,2 osmol/kg nahezu proportional an. Dieser Anstieg wird nach der Applikation von ionischem Stress durch die Zugabe von dem membranpermeablen Osmolyt Glycerol, sowie nach ionischem Stress durch die Zugabe von NaCl, Glukose oder Saccharose beobachtet (Epstein, 1986). Dabei stellt die Kaliumakkumulation unter hyperosmotischen Bedingungen in der Zelle nur einen transienten Zustand dar (Dinnbier *et al.*, 1988). Das im Cytoplasma akkumulierte Kalium bindet an die RNA-Polymerase und beeinflusst die ribosomale Transkription (Ennis *et al.*, 1961; Gralla und Vargase, 2006). Um einer Alkalisierung des Cytoplasmas durch die erhöhte Anzahl an Kaliumionen entgegen zu wirken, erfolgt in *E. coli* gleichzeitig die Synthese von Glutamat als Gegenion (Dinnbier *et al.*, 1988). Die Akkumulation von Glutamat beginnt eine Minute nach Erhöhung der Osmolarität und ist von der Kaliumaufnahme abhängig (McLaggan *et al.*, 1994). In Halobakterien wird mit Kalium gleichzeitig Chlorid aufgenommen und somit die Ladung kompensiert (Saum und Müller, 2007). Das Gegenion zu Kalium in *C. glutamicum* ist hingegen bisher nicht bekannt. In der zweiten Phase der Osmoadaptation werden die Kaliumionen durch neutrale kompatible Solute, d. h. niedermolekulare Substanzen, welche in

großen Mengen akkumuliert werden können ohne die Physiologie der Zelle zu stören, ersetzt. Somit sollen schädliche Effekte von zu hohen Ionenkonzentrationen im Cytoplasma vermieden werden. Sind solche kompatiblen Solute im Medium verfügbar, wird deren Import der langsameren und kostenintensiveren *de novo*-Synthese vorgezogen (Bremer und Krämer, 2000). Sowohl in *E. coli*- als auch in *C. glutamicum*-Zellen werden kompatible Solute aufgenommen oder das akkumulierte Kalium durch synthetisierte Trehalose (Dinnbier *et al.*, 1988) bzw. bei ausreichender Stickstoffversorgung durch synthetisiertes Prolin, Glutamat oder Glutamin (Wolf *et al.*, 2003; Rönsch *et al.*, 2003) ersetzt. Für die Aufnahme von kompatiblen Soluten besitzt *C. glutamicum* vier sekundär aktive, osmoregulierte Aufnahmesysteme (Peter *et al.*, 1998). Unter anderem ProP, das die Aufnahme von Prolin und Ectoin im Protonensymport vermittelt (Peter *et al.*, 1998), auf der Transkriptionsebene reguliert wird (Weinand *et al.*, 2007; Möker *et al.*, 2007) und unter hyperosmotischen Bedingungen im Proteom von *C. glutamicum* am stärksten induziert ist (Fränzel *et al.*, 2010). Das ebenfalls auf der Transkriptionsebene regulierte BetP transportiert ausschließlich Glycinbetain im Symport mit zwei Natriumionen (Peter *et al.*, 1996) und wird, wenn auch schwächer als ProP, unter hyperosmotischen Bedingungen ebenfalls induziert (Weinand *et al.*, 2007; Möker *et al.*, 2007; Fränzel *et al.*, 2010). Inwiefern die Induktion der Genexpression von *proP* und *betP* in *C. glutamicum* kaliumabhängig ist, ist bisher nicht untersucht worden. Vielmehr ist für *C. glutamicum* gezeigt worden, dass BetP als Chemosensor fungiert, und durch steigende intrazelluläre Kaliumkonzentrationen aktiviert wird (Schiller *et al.*, 2004; Wood, 2007). Dabei wird eine halbmaximale Aktivierung von BetP erst in Anwesenheit von 220 mM Kalium erreicht (Rübenhagen *et al.*, 2001).

## 1.2 Transport von Kalium

Da die meisten Prokaryoten intrazellulär eine Kaliumkonzentration aufrecht erhalten, die deutlich über der Umgebung liegt, müssen sie Kalium gegen den chemischen Gradienten in die Zelle transportieren (Epstein, 2003). Die auftretenden zellulären Mechanismen des Kaliumtransports über die Plasmamembran sind vielfältig, um sich unterschiedlichen Lebensräumen und Schwankungen im extrazellulären Kaliumangebot anzupassen (Stingl *et al.*, 2007). In der Vielzahl unterschiedlicher Transportsysteme, die sich in der energetischen Kopplung und ihrer Kinetik und Regulation unterscheiden, spiegelt sich die große Bedeutung von Kalium in Bakterien wider (Epstein, 2003). Es gibt aber auch Bakterien, die nur Kaliumkanäle besitzen (Stingl *et al.*, 2007), die evolutiv wahrscheinlich die älteste Form der Kaliumaufnahme darstellen und von denen sich aktive Carriersysteme abgeleitet haben (Durell *et al.*, 1999). Ob ein Kanal unter Stressbedingungen ausreichend ist, und welche Limitationen die alleinige Präsenz eines Kanals mit sich bringt, sowie Vor- und Nachteile bei der Verwendung von Kanälen oder Transportern für die Kaliumaufnahme, sind bisher nicht experimentell untersucht worden.

Für *C. glutamicum* sind zwei Kaliumaufnahme-systeme annotiert. Zum einen das von *cg0187* (*cgl0712*) codierte Protein, das ähnlich zu dem Kaliumtransporter Kup aus *E. coli* ist (Rhoads *et al.*, 1976; Bossemeyer *et al.*, 1989), und zum anderen das Gen *cg0887* (*cgl0777*), welches die Sequenz des Proteins CgIK codiert und als Hauptaufnahmesystem für Kalium unter niedrigen pH-Bedingungen identifiziert worden ist (Follmann *et al.*, 2009a).

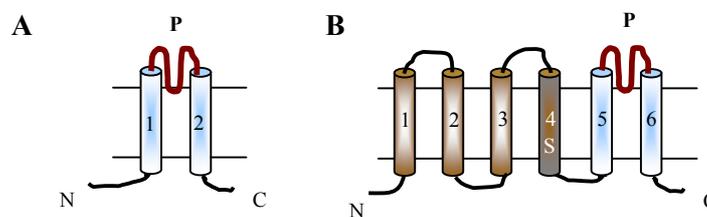
### 1.2.1 Kaliumkanäle

#### 1.2.1.1 Struktur und Funktion

Ionenkanäle erfüllen in bakteriellen Zellen viele unterschiedliche Aufgaben, die unter anderem der Signaltransduktion und der Regulation des Zellvolumens dienen (Hille, 1986). Über die physiologische Funktion prokaryotischer Kaliumkanäle gibt es, im Gegensatz zu sehr ausführlichen strukturellen Studien, nur wenige Erkenntnisse. Kaliumkanäle sind integrale Membranproteine, die mit hoher Selektivität den Durchtritt von Kaliumionen durch die Membran erlauben. Die Energie für den Ionendurchtritt wird durch den Kanal, der die Dehydratisierung des Ions bedingt, von *circa* 50 kcal\* $\text{mol}^{-1}$  auf 2-3 kcal\* $\text{mol}^{-1}$  herabgesetzt (Parsegian, 1969; Berneche und Roux, 2001). Die passive Diffusion der Kaliumionen wird entlang des elektrochemischen Gradienten durch den Kanal vermittelt, und kann beinahe die

freie Diffusionsgeschwindigkeit wie in Wasser erreichen (Hille, 2001). Die Kernstruktur aller Kaliumkanäle weist ein hohes Maß an struktureller Konservierung auf. Ein funktioneller Kaliumkanal besteht in der Regel aus vier Untereinheiten, die sich zu einem tetrameren Komplex zusammenlagern. Die Untereinheiten sind symmetrisch angeordnet und bilden in ihrem Zentrum eine wassergefüllte Pore aus (MacKinnon, 1991; Doyle *et al.*, 1998; MacKinnon *et al.* 2001). Allen Untereinheiten gemeinsam ist ein struktureller Kern aus zwei transmembranen Helices (TM), die durch eine Loop-Region (P-Loop) mit einer hochkonservierten Aminosäureabfolge TVGYGD verbunden sind. Durch die Zusammenlagerung der vier Loop-Regionen entsteht der Selektivitätsfilter des Kanals (Miller 1992; Jan und Jan, 1992).

Eine Untereinheit eines Kaliumkanals besteht somit im einfachsten Fall aus zwei Transmembrandomänen, was für Kanäle des 2TM-Typs charakteristisch ist (Abb. 1.2A). Zu dieser Klasse gehört beispielsweise der KcsA-Kanal aus *Streptomyces lividans*, dessen 3D-Struktur als erste Struktur eines Kaliumkanals aufgeklärt wurde (Doyle *et al.*, 1998). Auch wird der ebenfalls kristallisierte Kaliumkanal MthK aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* dazugezählt (Jiang *et al.*, 2002a,b). Komplizierter aufgebaut sind die K<sub>v</sub>-Kanäle (*voltage gated*), die über vier zusätzliche TM-Domänen verfügen und die Klasse des 6TM-Typs darstellen, wobei sich der P-Loop zwischen der TM5 und TM6 befindet (Abb. 1.2B). Zu dieser Klasse gehören u. a. die tierischen Kanäle der *Shaker*-Familie oder die pflanzlichen Kaliumkanäle AKT1 und KAT1 aus *Arabidopsis thaliana* (Sentenac *et al.*, 1992; Anderson *et al.*, 1992). Diesen Kanälen gemein sind positiv geladene Aminosäuren in der vierten Transmembrandomäne (S4-Helix), die einen Sensor darstellen, durch den eine spannungsabhängige Aktivierung bzw. Inaktivierung vermittelt wird.



**Abb. 1.2: Strukturtypen von Kaliumkanälen.** Kaliumkanäle können anhand der Anzahl ihrer transmembranen Helices (TM) unterschiedlichen Klassen zugeordnet werden. Viele bakterielle Kanäle gehören zum 2TM-Typ (A), dessen beide TMs über einen P-Loop (P) miteinander verbunden sind. Kaliumkanäle höherer Organismus gehören unter anderem zum 6TM-Typ, der über sechs TMs verfügt, wobei der P-Loop zwischen der TM5 und TM6 liegt und die TM4 einen Spannungssensor (S) beinhaltet.

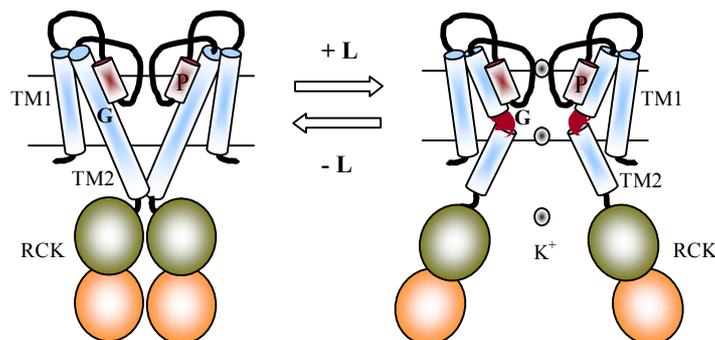
### 1.2.1.2 Permeation und *gating*-Mechanismen

Die funktionellen Eigenschaften von Kaliumkanälen basieren auf zwei fundamentalen Prozessen, der Permeation und dem *gating*. Der selektive und effiziente Transport der Kaliumionen über die Membran wird als Permeation bezeichnet, und von der hochkonservierten Filtersequenz koordiniert. Die Funktion dieser sogenannten „*signature-sequence*“ (Heginbotham *et al.*, 1994) ist das Abstreifen der Hydrathülle der Kaliumionen. Dabei werden die Carbonyl-Sauerstoffatome des Polypeptid-Rückgrates so ausgerichtet, dass sie die Rolle der Sauerstoffe aus den Wassermolekülen der Hydrathülle übernehmen (Zhou *et al.*, 2001). Auf diese Weise entstehen energetisch stabilisierte Positionen für die permeierenden Kaliumionen, so dass eine hohe Spezifität bei gleichzeitig hoher Transportrate gewährleistet ist.

Der Prozess des *gatings* ist der Permeation übergeordnet und kontrolliert den Ionenfluss. Man unterscheidet die funktionellen Kanalzustände offen und geschlossen (Neher und Sakmann, 1976). Befindet sich ein Kanal im geöffneten Zustand ist eine effiziente Ionenpermeation gewährleistet. Im geschlossenen Zustand findet hingegen kein Ionenfluss statt. Beim Wechsel zwischen dem geöffneten und dem geschlossenen Zustand kommt es zu einer Konformationsänderungen innerhalb des Kanals. Die Struktur, die direkt an diesem Prozess beteiligt ist, wird als *gate* bezeichnet. Basierend auf den bisherigen Kristallstrukturen von KcsA und MthK wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Überkreuzung der jeweils zweiten Transmembranhelices im tetrameren Komplex (*bundle crossing*) auf der cytoplasmatischen Seite eine Engstelle erzeugt, und als *gate* fungiert (Doyle *et al.*, 1998). Während der pH-abhängigen Aktivierung des KcsA-Kanals über einen Protonensensor im cytoplasmatischem Abschnitt der TM2 kommt es zu einer Rotationsbewegung der TM2-Helices und dadurch zur Vergrößerung des Durchmessers des inneren Vorraums (Thompson *et al.*, 2008; Perozo *et al.*, 1999; Cuello *et al.*, 2010). Für den MthK-Kanal wird diese Hypothese eines intrazellulären *gates* am Kreuzungspunkt der TM2-Helices ebenfalls unterstützt (Jiang *et al.*, 2002a,b).

Die Kontrolle des *gates*, der sogenannte *gating*-Mechanismus, ist für die Versorgung der Zelle mit physiologisch ausreichenden Mengen Kalium essentiell und kann physikalisch oder biochemisch reguliert sein. Dabei ist der *gating*-Mechanismus direkt oder indirekt mit dem *gate* gekoppelt (Hille, 2001), bewirkt aber kein fixes Umschalten des Kanals von geschlossen nach offen oder anders herum. Vielmehr wird durch ihn nur die Verweildauer im offenen Zustand, die sogenannte Offenwahrscheinlichkeit, beeinflusst. Ein *gating*-Mechanismus, der für die Kaliumkanäle KcsA und MthK beschrieben ist, beruht auf einem pH-abhängigen

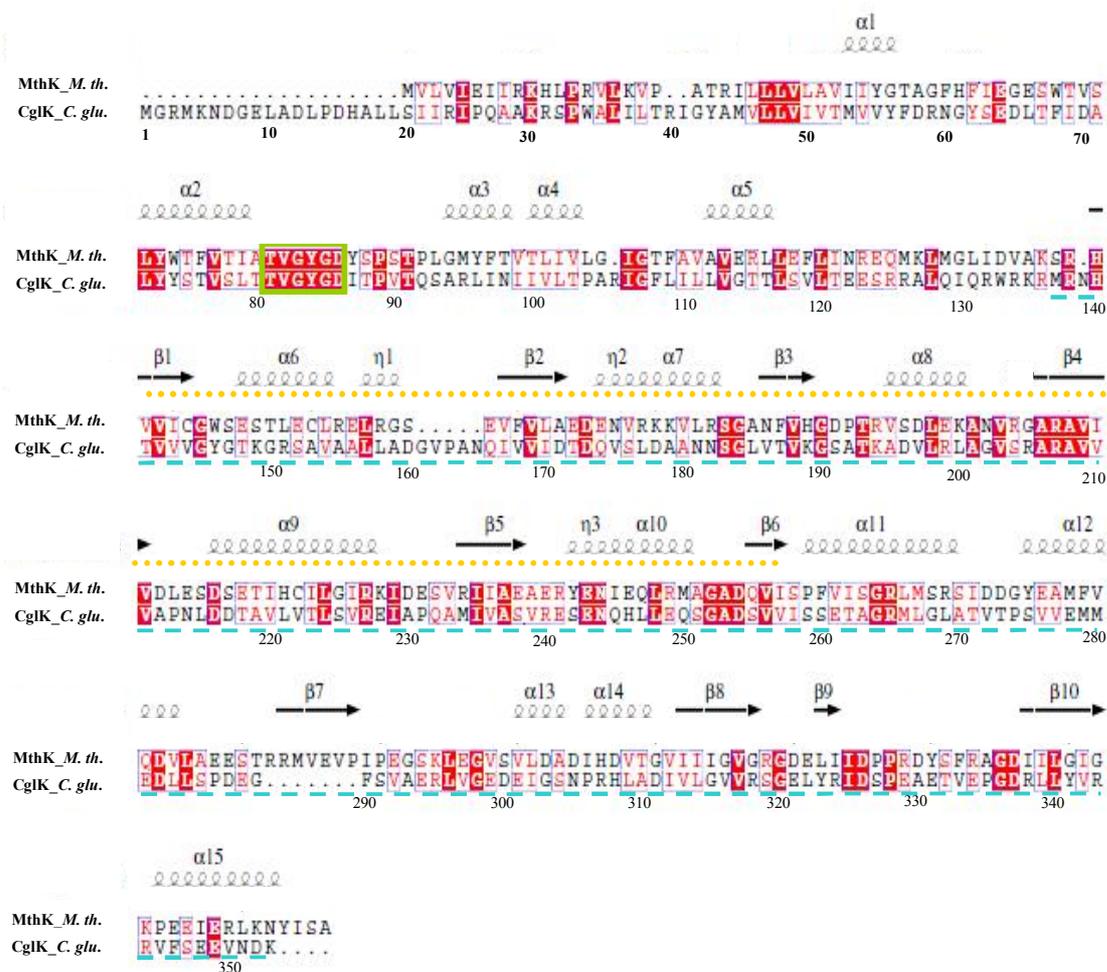
Konformationswechsel, wonach die innere Helix beim Öffnen des Kanals an einem konservierten Glycinrest in der zweiten Transmembrandomäne abknickt und sich beim Schließen wieder gerade ausrichtet (Magidovich und Yifrach, 2004; Chakrapani *et al.*, 2007). Ein weiteres Modell für den Kaliumkanal MthK beinhaltet ein ligandenabhängiges *gating* (Jiang *et al.*, 2002a,b) (Abb. 1.3). Der MthK-Kanal öffnet in Abhängigkeit von der cytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Strukturanalysen von MthK in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  zeigten eine offene Pore und einen großen cytoplasmatischen Komplex, der von acht C-terminalen RCK-Domänen, bzw. RCK-Proteinen (*regulator of conductance for  $\text{K}^+$* ) gebildet wird, und als *gating*-Ring fungieren soll (Li *et al.*, 2007; Kuo *et al.*, 2007). Durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in Abhängigkeit vom pH-Wert ändert sich die Konformation und damit der Durchmesser dieses *gating*-Rings, während das zusätzliche Abknicken der inneren Helices zur Öffnung des MthK-Kanals führt (Chakrapani *et al.*, 2007). Sowohl für KcsA, als auch für MthK wird eine intrinsische Kraft vermutet, die das Schließen des Kanals bewirkt und das Öffnen nur nach Ligandenbindung erlaubt. Ein möglicher *gating*-Mechanismus von CgIK ist unbekannt.



**Abb. 1.3: Ligandenabhängiger *gating*-Mechanismus des MthK-Kanals.** Der Ligand (L) bindet an den intrazellulären *gating*-Ring (RCK) (bestehend aus vier RCK-Domänen (grün) und vier RCK-Proteinen (orange)). Es kommt zu einer Erweiterung des *gating*-Rings, der mit dem zusätzlichen Einknicken am Glycin-Gelenk (G) in der inneren Helix der Transmembrandomäne TM2 zum Öffnen des Kanals führt. Die P-Loop-Regionen (P) sind als rote und die Transmembrandomänen als blaue Zylinder dargestellt. Kaliumionen werden durch kleine Kreise mit schwarzem Punkt in der Mitte symbolisiert.

### 1.2.2 Proteinsequenzvergleich von CgIK aus *C. glutamicum* mit MthK aus *M. thermoautotrophicum*

Ein Proteinsequenzvergleich des CgIK-Kanals aus *C. glutamicum* mit dem MthK Kanal aus *M. thermoautotrophicum* zeigt große Homologie, die sich in einer 24% identischen und 41% ähnlichen Sequenz, sowie einem E-value von  $1 \times 10^{-13}$  widerspiegelt (Abb. 1.4). In beiden Proteinen werden zwei transmembrane Sequenzabschnitte vorausgesagt, zwischen denen die Aminosäuren der konservierten Kaliumselektivitätsfiltersequenz TVGYGD liegen. Ab der 98. Aminosäure von CgIK wird ein ausschließlich cytoplasmatischer Bereich vorhergesagt, in dem ein Methionin an Position 137 (M137) auftritt.



**Abb. 1.4:** Aminosäurevergleich zwischen den Sequenzen der Kaliumkanäle MthK aus *M. thermoautotrophicum* und CgIK aus *C. glutamicum*. Der Sequenzvergleich zwischen den Aminosäuren von MthK und CgIK wurde mit Hilfe des Alignment-Programms Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) erstellt. Hierbei sind konservierte, identische Aminosäuren rot hinterlegt und isofunktionelle Aminosäuren blau umrandet. Die konservierte Konsensussequenz des Kaliumselektivitätsfilters ist grün umrandet. Der Bereich der cytoplasmatischen KTN-Domäne (ab M137) von CgIK ist mit einer hellblau gestrichelten Linie markiert. Über dem Sequenzvergleich sind Vorhersagen zur Sekundärstruktur in Form von  $\beta$ -Faltblättern und  $\alpha$ -Helices symbolisiert. Der Rossmann Fold ist durch eine gelb gepunktete Linie markiert (verändert nach K. Marin).

In diesem Sequenzabschnitt ab M137 befindet sich ein Rossmann Fold einer  $\beta$ - $\alpha$  Proteinstruktur, ähnlich den  $\text{NAD}^+$ -Bindedomänen von  $\text{NAD}^+$ -abhängigen Dehydrogenasen (Rossmann *et al.*, 1975), so dass dieser als KTN-Domäne (*K<sup>+</sup> transport nucleotide binding*) bezeichnet wird. Der Bereich erstreckt sich zwischen den Aminosäuren 142 bis 257, worin das putative glycinreiche Nukleotid-Bindemotiv GXGXXG (G145-G150) liegt. Im Unterschied dazu befindet sich in diesem Sequenzbereich von MthK, der als RCK-Domäne bezeichnet wird, eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestelle. Für das gesamte CgIK-Protein ist eine molekulare Größe von rund 36 kDa und für das mögliche KTN-Protein eine Größe von *circa* 27 kDa vorhergesagt (Follmann *et al.*, 2009a).

### 1.2.3 Kaliumtransporter

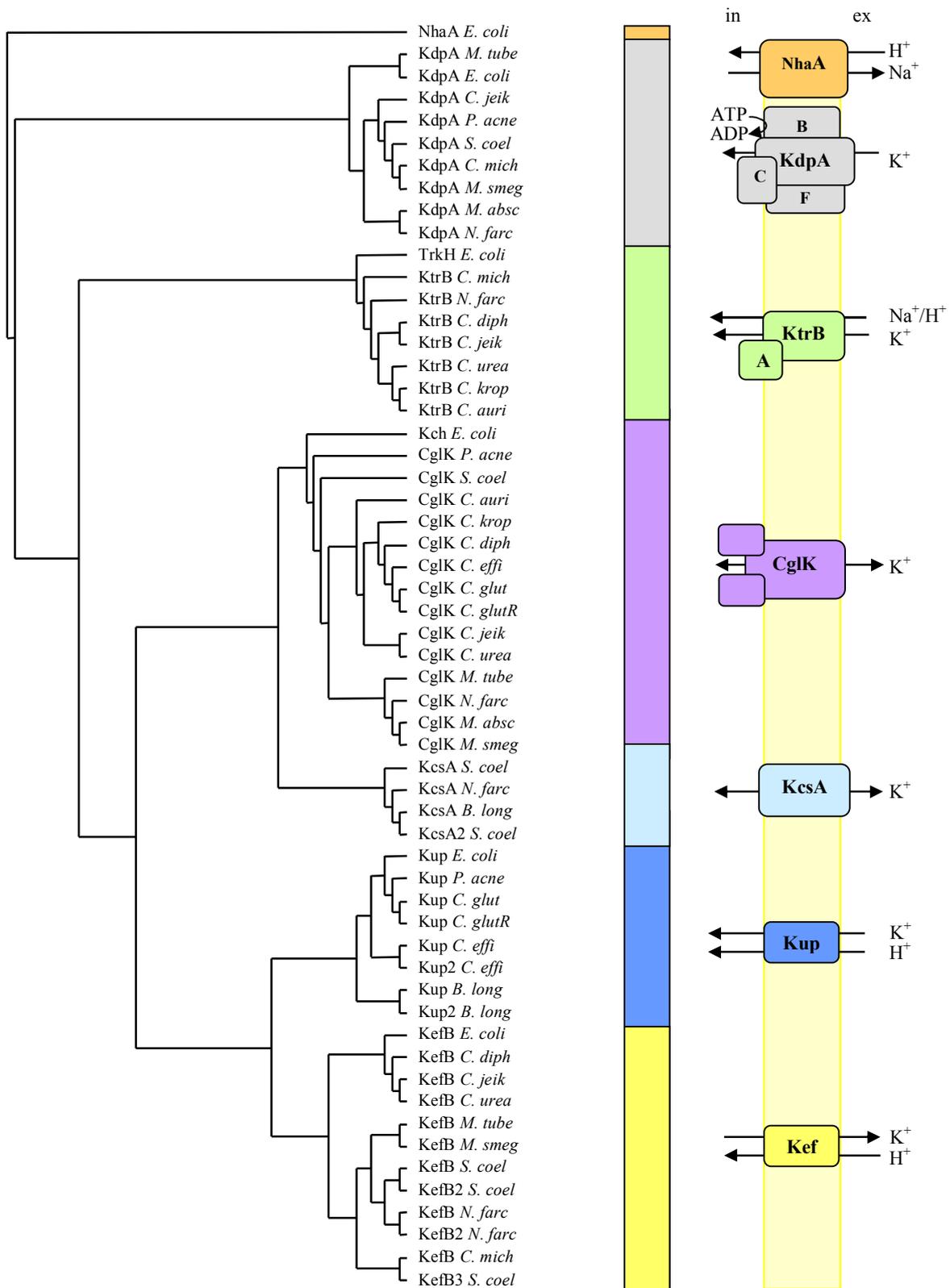
In vielen Bakterien sind zusätzlich zu Kaliumkanälen primär und sekundär aktive Kaliumtransporter vorhanden. Alle sekundär aktiven Systeme sind beim Transport der Kaliumionen über die Membran an einen elektrochemischen Gradienten gekoppelt (Epstein, 2003). *E. coli*-Zellen verfügen über unterschiedliche Kaliumtransportsysteme, über die es ihnen möglich ist hohe interne Kaliumkonzentrationen sowohl unter Standard-, als auch unter Stressbedingungen aufrecht zu erhalten (Kroll und Booth, 1981). Das Hauptaufnahmesystem für Kalium ist in *E. coli* das Trk-Transportsystem, das einen sekundär aktiven Kalium/Protonen-Symport mit mittlerer Affinität bei großer Maximalgeschwindigkeit vermittelt (Rhoads und Epstein, 1977). Der Trk-Komplex besteht aus einem membranintegrierten TrkH- oder TrkG-Protein und den cytoplasmatischen Proteinen TrkA und TrkE, denen eine regulatorische Funktion über  $\text{NADH}(\text{H}^+)$ - und ATP-Bindung zugeordnet wird (Stumpe *et al.*, 1996). Das monomere System Kup vermittelt in *E. coli* einen sekundär aktiven, natriumabhängigen Kalium/Protonen-Symport (Stumpe *et al.*, 1996) unter sauren hyperosmotischen Bedingungen (Trchounian und Kobayashi, 1999). Das in *E. coli* nur unter hyperosmotischen Bedingungen und bei Kaliummangel exprimierte Kdp-System ist ein primär aktiver Kaliumtransporter vom ATPase P-Typ, mit hoher Affinität und Spezifität für Kalium (Stumpe *et al.*, 1996; Epstein, 2003). Es handelt sich um ein induzierbares System, dessen Expression über ein Zwei-Komponentensystem reguliert wird (Jung und Altendorf, 1998). Die membranintegrierte KdpA-Untereinheit des KdpFABC-Komplexes besitzt einen Kaliumselektivitätsfilter und ist für die Permeation der Kaliumionen verantwortlich.

Ein weiterer Kaliumtransporter in Prokaryoten ist das Ktr-System, das mit dem Trk-Komplex verwandt ist, vor allem in Gram-positiven Bakterien auftritt und aus zwei Untereinheiten,

KtrA und KtrB, die TrkA und TrkH ähnlich sind, besteht (Nakamura *et al.*, 1998). *Bacillus subtilis* verfügt über zwei Ktr-Systeme, KtrAB und KtrCD, mit unterschiedlichen Affinitäten im millimolaren Bereich, die an der Anpassung an hyperosmotische Bedingungen beteiligt sind (Holtmann *et al.*, 2003). Das Ktr-System aus *Vibrio alginolyticus* ist energetisch an einen Natrium-Symport gekoppelt (Tholema *et al.*, 1999) und hat einen  $K_m$ -Wert von rund 50  $\mu\text{M}$  (Nakamura *et al.*, 1998). Die membranintegrierte KtrB-Untereinheit ist für die Kaliumpermeation zuständig. Das cytoplasmatische KtrA-Protein gehört hingegen zur Familie der KTN-Proteine, die wie die ähnlichen RCK-Domänen in unterschiedlichen Kaliumkanälen auftreten (Roosild *et al.*, 2002; Kröning *et al.*, 2007) und an der Regulation beteiligt sind (Tholema *et al.*, 2005). Die KtrA-Proteine beinhalten einen Rossmann Fold mit einem glycinreichen Nukleotid-Bindemotiv, an das NAD/NADH oder ATP mit unterschiedlichen Affinitäten binden, und die Oligomerisierung des Komplexes beeinflussen kann (Roosild *et al.*, 2002, Kröning *et al.*, 2007). Für *C. glutamicum* ist ein solches Ktr-System nicht bekannt.

Bioinformatische Vergleichsanalysen von Kaliumaufnahme-systemen in Actinobakterien mit bekannten Systemen aus *E. coli* und *Streptomyces coelicolor* haben gezeigt, dass in nicht-pathogenen Stämmen vorwiegend Kaliumkanäle und niedrig-affine Kaliumtransporter auftreten, während pathogene Stämme überwiegend mit hoch-affinen Kaliumtransporter ausgestattet sind (Ochrombel *et al.*, 2011). In allen Stämmen der untersuchten Actinobakterien treten die Kanäle KcsA (Li *et al.*, 1998) und CgIK entweder einzeln oder zusammen auf (Abb. 1.5). Zum Trk-Transporter aus *E. coli* ähnliche Proteinkomplexe oder Kdp-Aufnahmesysteme kommen nahezu ausschließlich in pathogenen Stämmen vor. Kup-Transporter findet man hingegen überwiegend in nicht-pathogenen Zellen. In welchem Zusammenhang das Auftreten der unterschiedlichen Kaliumaufnahme-systeme steht, und warum einige Stämme mit einer Vielzahl von Transportern, hingegen andere nur mit einem Kaliumkanal ausgestattet sind, ist bisher untersucht.

# Einleitung



**Abb. 1.5: Vorkommen unterschiedlicher Kaliumaufnahme-systeme in Actinobakterien.** Proteine, die Ähnlichkeit zu den bekannten Kaliumtransportern KefB, TrkH, KdpA, den Kaliumkanälen KcsA und Kch aus *Streptomyces coelicolor* (*S. coel*), bzw. *E. coli* und dem Natriumtransporter NhaA aus *E. coli* haben, wurden durch einen Sequenzvergleich mit den Proteomen von *C. aurimucosum* (*C. auri*), *C. diphtheriae* (*C. diph*), *C. efficiens* (*C. effi*), *C. glutamicum* (*C. glut*), bzw. dessen Stamm R (*C. glutR*), *C. jeikeium* (*C. jeik*), *C. urealyticum* (*C. urea*), *C. kroppenstedtii* (*C. krop*), *M. tuberculosis* (*M. tube*), *M. abscessus* (*M. absc*), *Nocardia farcinica* (*N. farc*), *Propionibacterium acnes* (*P. acne*), *Streptomyces avermitilis* (*S. diph*), *Bifidobacterium longum* (*B. long*) und *Clavibacter michiganensis* (*C. mich*) mittels Blast identifiziert, mit Hilfe von ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) verglichen und in einem Kladogramm im Tree View (Page, 1996) dargestellt (verändert nach Ochrombel *et al.*, 2011).

### 1.3 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollten Mechanismen der Stressantwort von *C. glutamicum* analysiert werden. Bezüglich der pH-Stressantwort von *C. glutamicum* sollten veränderte Stoffwechselprozesse auf physiologischer und enzymatischer Ebene näher untersucht und in einen funktionellen Zusammenhang gebracht werden. Um die Bedeutung von Kalium und dessen Aufnahme bei der Stressanpassung näher zu charakterisieren, sollten Stressbedingungen definiert werden, unter denen Kalium essentiell für die *C. glutamicum*-Zelle ist. Dabei sollte der bioenergetische Einfluss von Kalium auf die Zelle bezüglich der Stressantwort näher betrachtet werden. Inwiefern CgIK unter den definierten Stressbedingungen das Hauptaufnahmesystem für Kalium darstellt, sollten physiologische und biochemische Untersuchungen klären. Desweiteren sollte die heterologe Expression von *cgIK* und Aufreinigung markierter CgIK-Proteine etabliert werden, um deren Aufbau und die Funktion näher zu untersuchen. Zudem wurde eine elektrophysiologische Charakterisierung angestrebt, wozu mögliche experimentelle Ansätze getestet werden sollten. Zur Untersuchung der Regulation von CgIK sollte der Einfluss der KTN-Module durch die Konstruktion unterschiedlicher CgIK-Varianten auf verschiedenen experimentellen Ebenen analysiert werden.

Ob die CgIK-vermittelte Kaliumaufnahme in *C. glutamicum* eine Limitation darstellt, und unter welchen Bedingungen die Anwesenheit eines aktiven Kaliumtransporters physiologische Auswirkungen auf die Zellen hat, sollte anhand der heterologen Expression eines geeigneten Transporters untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Organismen

Die Tab. 2.1 gibt die in dieser Arbeit verwendeten *C. glutamicum*- und *E. coli*-Stämme, sowie relevante Genotypen wieder.

**Tab. 2.1: Verwendete *E. coli* und *C. glutamicum*-Stämme und ihre Eigenschaften**

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>C. glutamicum</i>	ATCC 13032, Wildtyp (WT)	Abe <i>et al.</i> , 1967
WT_pEKEx2	ATCC 13032 mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pEKEx2, Km <sup>r</sup>	Diese Arbeit
$\Delta kup$	ATCC 13032 mit Deletion des Gens <i>cgl0712</i>	Becker, 2007
$\Delta cglK$	ATCC 13032 mit Deletion des Gens <i>cgl0777</i>	Becker, 2007
$\Delta cglK\Delta kup$	ATCC 13032 mit Deletion der Gene <i>cgl0712</i> und <i>cgl0712</i>	Becker, 2007
$\Delta cglK\Delta kup$ _pEKEx2	$\Delta cglK\Delta kup$ mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pEKEx2, Km <sup>r</sup>	Diese Arbeit
$\Delta cglK\Delta kup$ _pEKEx2_GFP_ <i>cglK</i>	$\Delta cglK\Delta kup$ mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pEKEx2 mit N-terminal GFP-markiertem <i>cgl0777</i> , Km <sup>r</sup>	Diese Arbeit
$\Delta cglK\Delta kup$ _pEKEx2_ <i>cglK</i>	$\Delta cglK\Delta kup$ mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pEKEx2 mit C-terminal Strep-markiertem <i>cgl0777</i> , Km <sup>r</sup>	Becker, 2007
$\Delta cglK\Delta kup$ _pEKEx2_ <i>cglK</i> _M137Stop	$\Delta cglK\Delta kup$ mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pEKEx2_ <i>cglK</i> _M137Stop, Km <sup>r</sup>	Diese Arbeit
$\Delta cglK\Delta kup$ _pEKEx2_ <i>cglK</i> _M137I	$\Delta cglK\Delta kup$ mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pEKEx2_ <i>cglK</i> _M137I, Km <sup>r</sup>	Diese Arbeit
$\Delta cglK\Delta kup$ _pEKEx2_ <i>cglK</i> _H140R	$\Delta cglK\Delta kup$ mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pEKE2_ <i>cglK</i> _H140R, Km <sup>r</sup>	Diese Arbeit
$\Delta cglK\Delta kup$ _pEKEx2_ <i>cglK</i> _H246R	$\Delta cglK\Delta kup$ mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pEKEx2_ <i>cglK</i> _H246R, Km <sup>r</sup>	Diese Arbeit
$\Delta cglK\Delta kup$ _pEKEx2_ <i>cglK</i> _H308R	$\Delta cglK\Delta kup$ mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pEKEx2_ <i>cglK</i> _H308R, Km <sup>r</sup>	Diese Arbeit
$\Delta cglK\Delta kup$ _pEKEx2_ <i>cglK</i> _H140R_H246R	$\Delta cglK\Delta kup$ mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pEKEx_ <i>cglK</i> _H140R_H246R, Km <sup>r</sup>	Diese Arbeit
$\Delta cglK\Delta kup$ _pEKEx2_ <i>cglK</i> _H140R_H308R	$\Delta cglK\Delta kup$ mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pEKEx2_ <i>cglK</i> _H140R_H308R, Km <sup>r</sup>	Diese Arbeit
$\Delta cglK\Delta kup$ _pEKEx2_ <i>cglK</i> _H140R_H246R_H308R	$\Delta cglK\Delta kup$ mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pEKEx2_ <i>cglK</i> _H140R_H246R_H308R, Km <sup>r</sup>	Diese Arbeit
$\Delta cglK\Delta kup$ _pEKEx2_ <i>cglK</i> _H140R_H308R	$\Delta cglK\Delta kup$ mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pEKEx2_ <i>cglK</i> _H140R_H308R, Km <sup>r</sup>	Diese Arbeit
$\Delta cglK\Delta kup$ _pEKEx2_ <i>cglK</i> _H246R_H308R	$\Delta cglK\Delta kup$ mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pEKEx2_ <i>cglK</i> _H246R_H308R, Km <sup>r</sup>	Diese Arbeit

## Material und Methoden

<i>Katalase</i> <sup>-</sup>	ATCC 13032 mit pDrive-Insertion im Gen <i>cgl0255</i> Km <sup>r</sup>	Diese Arbeit
WT_pEKEx2_ <i>ptrBA</i> _Strep	WT_pEKEx2_ <i>ptrBA</i> _Strep	Diese Arbeit
$\Delta$ <i>cglK</i> $\Delta$ <i>kup</i> _pEKEx2_ <i>ptrBA</i> _Strep	$\Delta$ <i>cglK</i> $\Delta$ <i>kup</i> _pEKEx2_ <i>ptrBA</i> _Strep	Diese Arbeit
WT_pEKEx2_ <i>ahpC</i> _Strep	WT mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pEKEx2_ <i>ahpC</i> _Strep, Km <sup>r</sup>	Diese Arbeit
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5 $\alpha$ MCR	<i>endA1 supE44 thi-1 <math>\lambda</math> recA1 gyrA96 relA1 deoR</i> $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 $\Phi$ 80 $\Delta$ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mmr</i> <i>hsdRMS mcrBC</i> )	Grant <i>et al.</i> , 1990
BL21	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> <i>dcm ompT hsdS</i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) <i>gal</i>	Studier <i>et al.</i> , 1986
BL21_pET52b_ <i>cglK</i>	BL21 mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pET52b_ <i>cglK</i> , Carb <sup>r</sup>	Becker, 2007
BL21_pET52b_ <i>KTN</i>	BL21 mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pET52b_ <i>KTN</i> , Carb <sup>r</sup>	Diese Arbeit
TK2309	(K12 Derivat) F- <i>thi, rha, lacZ, nagA, trkD1,</i> <i>trkA405, kdp::Tn10</i>	W. Epstein, Chicago, USA
TK2309_pTrc_ <i>cglK</i>	TK2309 mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pTrc_ <i>cglK</i> , Amp <sup>r</sup>	Diese Arbeit
TK2309_ <i>cglK_M137I</i>	TK2309 mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pTrc_ <i>cglK_M137I</i> , Amp <sup>r</sup>	Diese Arbeit
TK2309_ <i>cglK_M137Stop</i>	TK2309 mit extrachromosomal vorliegendem Expressionsvektor pTrc_ <i>cglK_M137Stop</i> , Amp <sup>r</sup>	Diese Arbeit

## 2.2 Plasmide

In der folgenden Tab. 2.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Plasmide aufgelistet.

**Tab. 2.2: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmide**

Plasmid	Charakteristika	Referenz
pDrive	A-T Klonierungsvektor, Km <sup>r</sup> , Am <sup>r</sup> , <i>p lpp/lac'</i> , fl ori; 3850 bp	Qiagen, Hilden
pEKEx2	Km <sup>r</sup> fl ori	Eikmanns <i>et al.</i> , 1991
pEKEx2_ <i>cglK</i>	pEKEx2 mit <i>cgl0777</i>	Becker, 2007
pEKEx2_GFP	pEKEx2_mit enthaltener Gensequenz für GFP	Diese Arbeit
pEKEx2_GFP_ <i>cglK</i>	pEKEx2 mit GFP_ <i>cglK</i>	Diese Arbeit
pEKEx2_ <i>cglK_M137Stop</i>	pEKEx2 mit <i>cgl0777_M137Stop</i>	Diese Arbeit
pEKEx2_ <i>cglK_M137I</i>	pEKEx2 mit <i>cgl0777_M137I</i>	Diese Arbeit
pEKEx2_ <i>cglK_H140R</i>	pEKEx2 mit <i>cgl0777_H140R</i>	Diese Arbeit
pEKEx2_ <i>cglK_H246R</i>	pEKEx2 mit <i>cgl0777_H246R</i>	Diese Arbeit
pEKEx2_ <i>cglK_H308R</i>	pEKEx2 mit <i>cgl0777_H308R</i>	Diese Arbeit
pEKEx2_ <i>cglK_H140R_H246R</i>	pEKEx2 mit <i>cgl0777_H140R_H246R</i>	Diese Arbeit
pEKEx2_ <i>cglK_H140R_H308R</i>	pEKEx2 mit <i>cgl0777_H140R_H308R</i>	Diese Arbeit

## Material und Methoden

pEKEx2_cglK_H140R_H246R_H308R	pEKEx2 mit <i>cgl0777_H140R_H246R_H308R</i>	Diese Arbeit
pEKEx2_cglK_H140R_H308R	pEKEx2 mit <i>cgl0777_H140R_H308R</i>	Diese Arbeit
pEKEx2_cglK_H246R_H308R	pEKEx2 mit <i>cgl0777_H246R_H308R</i>	Diese Arbeit
pEKEx2_cglK_G145	pEKEx2 mit <i>cgl0777_G145</i>	Diese Arbeit
pEKEx2_cglK_G147	pEKEx2 mit <i>cgl0777_G147</i>	Diese Arbeit
pEKEx2_cglK_G150	pEKEx2 mit <i>cgl0777_G150</i>	Diese Arbeit
pEKEx2_ktrBA_Strep	pEKEx2 mit <i>pre300_jk0347-jk0348</i> aus <i>C. jeikeium</i> mit deletiertem Stopcodon und Strep-Tag	Diese Arbeit
pEKEx2_ahpC_Strep	pEKEx2 mit <i>b0605-b0606</i> aus <i>E. coli</i> mit deletiertem Stopcodon und Strep-Tag	Diese Arbeit
pEKEx2_Katalase	pEKEx2 mit <i>cgl0255</i> mit deletiertem Stopcodon und Strep-Tag	Diese Arbeit
pET-52b	Expressionsvektor für <i>E. coli</i>	Qiagen
pET-52b_cglK	pET-52b mit <i>cgl0777</i>	Becker, 2007
pET-52b_KTN	pET-52B mit <i>KTN</i> (ab M137 aus <i>cgl0777</i> )	Diese Arbeit
pDrive-icgl0255	pDrive mit internem Fragment von <i>cgl0255</i> (iKat)	Diese Arbeit
pTrcMscSH <sub>6</sub> (pTrcYH <sub>6</sub> )	<i>NcoI-HindIII mscS</i> -bearing fragment cloned into <i>NcoI-HindIII</i> sites of pTrc99a	S. Miller
pTrc_cglK	<i>NcoI-HindIII cglK</i> -bearing fragment cloned into <i>NcoI-HindIII</i> sites of pTrc99a	Diese Arbeit
pTrc_cglK_M137I	pTrc_cglK mit M137I	Diese Arbeit
pTrc_cglK_M137Stop	pTrc_cglK mit M137Stop	Diese Arbeit

### 2.3 Oligonukleotide

In der folgenden Tab. 2.3 sind die verwendeten Oligonukleotide (Primer) sowie deren Basensequenz aufgeführt. Die Primer wurden von Operon (Köln) bezogen und in H<sub>2</sub>O gelöst (100 nmol/ml). Primer, die zum Sequenzieren verwendet wurden, wurden auf 10 nmol/ml verdünnt.

**Tab. 2.3:** Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotide	Basensequenz (5' - 3')
CglK_Ile_5'	GCA AAT CCA ACG TTG GAG AAA ACG CAT CCG CAA CCA CAC CGT CG
CglK_Ile_3'	CGACGGTGTGGTTGCGGATGCGTTTTCTCCAACGTTGGATTTGC
CglK_Stop_5'	GCA AAT CCA ACG TTG GAG AAA ACG CTA GCG CAA CCA CAC CGT CG
CglK_Stop_3'	CGACGGTGTGGTTGCGCTAGCGTTTTCTCCAACGTTGGATTTGC
KTN_5'	GTCCATGGTAATGCGCAACCACACCGTCGTTGTC
KTN_3'	GTGTCGACTTTGTCATTTACCTCCTCGCTAAATAC
<i>cg0310_5'</i> ( <i>cgl0255_5'</i> ) (iKat)	TTCCAGAGCGTATCCCTCAC
<i>cg0310_3'</i> ( <i>cgl0255_3'</i> ) (iKat)	TAGAGGTCTTCGCGCTGGTA
Pre300_cg0310_5'	TGGGCGTCGTTACGCTCTTT
Cgl0777_Kont_3'	CCA CCA ATG GCT CGA AGA
Cgl0777_Kont_5'	ACC TCG CAG CTC CAC AAT
Cgl0712_Kont_3'	GCC AGT CGT AGA ATC AGT
Cgl0712_Kont_5'	CTG CGA TTG GAG GAG TAA
M13_forward	CAAAAGGGTCAGTGCTGC
M13_reverse	TTCACACAGGAAACAGCTATGACC
pEXEx2_forward	ATCGGCTCGTATAATGTG
pEXEx2_reverse	CCGCTTCTGCGTTCTGATTT

## Material und Methoden

CglK_CHis_Ue_5'	GCCCATGGGCCGAATGAAAAACGATGGTG
CglK_CHis_Ue3'	GCGTCGACTTTGTCAATTTACCTCCTCGCT
CglK_CStrep_Ue_5'	GCGCTAGCTTTGTCAATTTACCTCCTCGCTA
CglK_CStrep_Ue_3'	GCCCTGCAGGATGGGCCGAATGAAAAACGA
AhpC_CHis_Ue_5'	GCGGATCCAGGAGACCTTTTATGTCCTTGATTAACACCAAAATTAACCTTTTAAAAACC
AhpC_CHis_Ue_3'	GCGAGCTCCTATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCATGCAGTTTGGTGCGAATCAGGTAG
Pre300_Ue_Ktr_Cjeik_5'	GCCTGCAGGGAGACTCAGCCCGTGTGCGTTTGC
Ue_Ktr_CStrep_Cjeik_3'	GCGAATTCGCTATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAGGAATCCGCAAACCTTATCCAGGT
Katalase_Ue_5'	GCCTGCAGAATACCAGTTCAGACCGGGGTCACCATAAAGGTGTGTAGGGG
Katalase_Ue_CStrep_3'	GCCTATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAAGCCTTCTTCTGGAGGTAAAG
CglK_His1_5' (His140R)	GGAGAAAACGCATGCGCAACGCCACCGTCGTTGTCGGATACGG
CglK_His1_3' (His140R)	CCGTATCCGACAACGACGGTGGCGTTGCGCATGCGTTTTCTCC
CglK_His2_5' (His246R)	CGAGAATCTGAAAACCAAGCCCTCCTCGAACAAATCCGGTGC
CglK_His2_3' (His246R)	GCACCGGATTGTTTCGAGGAGGGCTTGGTTTTTCAGATTCTCG
CglK_His3_5' (His308R)	CGGCTCCAACCCACGAGCCCTCGCTGACATCGTCTCCGGTGTGTTCG
CglK_His3_3' (His308R)	CGAACAAACCCGAGGACGATGTCAGCGAGGGCTCGTGGGTTGGAGCCG
CglK_G1_5'	GCATGCGCAACCACACCGTCGTTGTCGCATACGGAACCAAAGTTCGC
CglK_G1_3'	GCGACCTTTGGTTCCGTATGCGACAACGACGGTGTGGTTGCGCATGC
CglK_G2_5'	GCGCAACCACACCGTCGTTGTCGGATACGCAACCAAAGGTTCGCTCC
CglK_G2_3'	GGAGCGACCTTTGGTTGCGTATCCGACAACGACGGTGTGGTTGCGC
CglK_G3_5'	CGTTGTCGGATACGGAACCAAAGCTCGCTCCGCGGTTCGCTGCACTGC
CglK_G3_3'	GCAGTGCAGCGACCGCGGAGCGAGCTTTGGTTCCGTATCCGACAACG
CglK_Neo1_5'	GCCCATGGGCCGAATGAAAAACGATGG
CglK_Xho1_3'	GCCTCGAGTTTGTCAATTTACCTCCTCGC
pTrcYH6_5'	GCCGACATCATAACGGTTCT
pTrcYH6_3'	ACCGCTTCTGCGTTCTGATT
Pore_CglK_Xho1_3'	GCCTCGAGGCGTTTTCTCCAACGTTGG

## 2.4 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

### 2.4.1 Komplexmedien für *E. coli*

Als Komplexmedien wurden LB- bzw. LK-Medium verwendet, eine Variation von Luria Broth (Sambrook *et al.*, 1989) in der KCl durch NaCl ersetzt wird (Rowland *et al.*, 1984).

LB-Medium (1 l):

Trypton	10 g
Hefeextrakt	10 g
NaCl	5 g

LK-Medium (1 l):

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
KCl	6,4 g

Diesem Medium konnten 14 g/l Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA) für die Herstellung von Agarplatten zugesetzt werden. Für die Herstellung superkompetenter *E. coli*-Zellen wurden zudem noch TB-Puffer (10 mM PIPES, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, 55 mM MnCl<sub>2</sub>; mit KOH auf pH 6,7 eingestellt) und SOB-Medium (2,5 mM KCl; 10 mM NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 2% Trypton; 0,5% Hefeextrakt) benötigt. Außerdem wurde SOC-Medium (wie SOB mit 20 mM Glukose) für die Transformation der *E. coli*-Zellen verwendet.

#### 2.4.2 Komplexmedien für *C. glutamicum*

Zur Kultivierung von *C. glutamicum* wurde BHI-Medium (Brain-Heart-Infusion; DIFCO/BD, Detroit, USA) als Flüssigmedium (37 g/l H<sub>2</sub>O) benutzt. Für die Kultivierung auf Agarplatten wurden dem Medium 15 g/l Bacto-Agar (Difco) zugesetzt. Die Anzucht zur Herstellung von kompetenten Zellen für die Transformation durch Elektroporation erfolgte in 100 ml LB-Medium, das die Wachstumsinhibitoren Isonicotinsäurehydrazid (4 g/l), Glycin (25 g/l) und Tween-80 (1 g/l) enthielt (Haynes und Britz, 1989). Die Regeneration der Zellen erfolgte in BHIS-Medium (37 g/l Brain-Heart-Infusion; 0,5 M Sorbitol).

#### 2.4.3 Minimalmedium für *E. coli*

##### 2.4.3.1 K<sub>x</sub>-Medium

Das Minimalmedium wurde von Epstein und Kim (1971) entwickelt, um bei unterschiedlichen K<sup>+</sup>-Konzentrationen eine unveränderte Pufferkapazität des Mediums aufrecht zu erhalten. Dieses Medium wird als K<sub>x</sub>-Medium bezeichnet, wobei x die finale K<sup>+</sup> Konzentration in mM angibt. Dem Medium wurden dann die Wachstumssupplemente hinzugefügt.

##### K<sub>120</sub>-Medium (1 l)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	10,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,12 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,05 g

##### K<sub>0</sub>-Medium (1 l)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	16,47 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	3,12 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,05 g

Für Medium, das weniger als 120 mM K<sup>+</sup> enthalten sollte, wurde die Konzentration mittels der Zugabe von 1 M KCl eingestellt. Wachstumssupplemente und Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren steril hinzugefügt.

#### 2.4.3.2 K<sub>x</sub>-Agarplatten

Für K<sub>x</sub>-Agarplatten wurden 14 g Agar pro Liter in 4/5 Volumen H<sub>2</sub>O autoklaviert. 5 x K<sub>120</sub>-Medium wurde dann zum korrekten Endvolumen aufgefüllt. Wachstumssupplemente wurden nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur unter 60°C hinzugefügt. Für Agarplatten, die weniger als 10 mM K<sup>+</sup> enthalten, wurde der Agar zuerst mit 1 M NaCl und dann dreimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen um K<sup>+</sup>-Spuren auszuwaschen.

#### 2.4.3.3 Wachstumssupplemente

Tab. 2.1: Wachstumssupplemente für das Minimalmedium für *E. coli*

Supplement	Stock	Verdünnung	Endkonz.
D-Glukose	20% (w/v)	100 x	0,2% (w/v)
Thiamin HCl <sup>a</sup>	0,01% (w/v)	100 x	0.001% (w/v)
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	40 mM	100 x	0,4 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> x FeSO <sub>4</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	6 mM	1000 x	6 µM

<sup>a</sup>Stock wurde in 0,1 M HCl gelöst

#### 2.4.4 Minimalmedien (MMI) für *C. glutamicum*

Für Kultivierungen in Mikrotiterplatten, in Schüttelkolben sowie in Fermentern wurde MMI (Mineralsalzmedium I, Kase und Nakayama, 1972) verwendet. Zur Herstellung dieses Mediums wurden 916 ml einer Stammlösung angefertigt und autoklaviert, die 5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 g Harnstoff, 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 3 H<sub>2</sub>O (pH 7,0 KOH) enthielt. Sollte kaliumfrei kultiviert werden, wurden KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> äquimolar durch 2,29 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O und 1,63 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ersetzt (pH 7,0 NaOH). Die restlichen Bestandteile wurden getrennt angesetzt und sterilisiert. Dabei wurden 80 ml 50%ige Glukose (w/v), sowie 1 ml 1% (w/v) CaCl<sub>2</sub>, 1 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>, 1 ml 0,02% Biotin, und 1 ml Spurenelementlösung (1 g FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 1 g MnSO<sub>4</sub> 7 x H<sub>2</sub>O, 0,1 g ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 0,021 g CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O, 2 mg NiCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O ad 100 ml H<sub>2</sub>O) der Stammlösung hinzugefügt.

Sollte das Medium erhöhte Konzentrationen von NaCl, KCl, Glukose, Saccharose oder Sorbitol enthalten, wurden die entsprechenden Substanzen in den gewünschten Endkonzentrationen zugegeben. Für die Bestimmung der Osmolalität eines Puffers oder Mediums wurde ein Osmometer (Osmomat 030, Gonotec, Berlin) verwendet, wobei mittels Standards Eichgeraden erstellt wurden (persönliche Mitteilung K. Marin). Auch konnten diesem Medium 15 g/l Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA) für die Herstellung von Agarplatten zugesetzt werden. Für die Einstellung bestimmter pH-Werte wurden jeweils 250 mM Puffersubstanz hinzugefügt (MES: pH 6,0-6,5; MOPS: pH 7,0-7,5; CHES: pH 8,0-9,0).

### 2.4.5 Antibiotika und IPTG

Alle Antibiotika und IPTG (Tab. 2.5) wurden in H<sub>2</sub>O gelöst, steril filtriert (Whatman 0,45 µm WCN Cellulose Nitrate Filter) und den sterilen Medien (für Agarplatten auf ca. 60°C abgekühlt) zugegeben. Die Aufbewahrung fand bei -20°C statt.

Tab. 2.2: Antibiotika und IPTG

Antibiotikum	Stock	Verdünnung	Endkonz.
Ampicillin	2,5 mg x ml <sup>-1</sup>	100 x	25 µg x ml <sup>-1</sup>
Kanamycin	25 mg x ml <sup>-1</sup>	1000 x	25 µg x ml <sup>-1</sup>
Carbenicillin	25 mg x ml <sup>-1</sup>	1000 x	25 µg x ml <sup>-1</sup>
Cephalexin	10 mg x ml <sup>-1</sup>	166 x	60 µg x ml <sup>-1</sup>
IPTG	238 mg x ml <sup>-1</sup>	1000 x	1 mM

## 2.5 Kultivierungsbedingungen

### 2.5.1 Stammhaltung und Vorkulturen

Zur Stammhaltung von *C. glutamicum* und *E. coli* wurden Gefrierkulturen in Roti®-Store Cryoröhrchen (Roth, Karlsruhe) bei -80°C aufbewahrt. Kurzzeitige Lagerung fand bei 4°C auf Komplexmedium-Agarplatten für einen Monat statt.

### 2.5.2 Kultivierung von *E. coli*

Flüssigkulturen von *E. coli* wurden bei 37°C in einem New Brunswick Scientific Co. Ltd. G-25 Inkubator Schüttler bei 400 rpm inkubiert. Das Wachstum der Bakterien wurde durch das Messen der optischen Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) in einem Photometer (Pharmacia Biotech

Novaspec II spectrophotometer) dokumentiert. Über einer  $OD_{600}$  von 0,8 wurden die Proben 1:10 in Medium verdünnt. Die spezifische Wachstumsrate ( $\mu$ ) wurde berechnet, indem die  $OD_{600}$  auf der y-Achse halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Die Verdopplungszeit (t) wurde aus der Steigung der linearen Beziehung berechnet, so dass die Rate  $\mu$  berechnet werden konnte (Gleichung 2).

$$\mu = (\ln 2) / t \quad \text{(Gleichung 2)}$$

Um das Wachstum einer Kultur zu dokumentieren, wurde eine einzelne Kolonie in 5 ml Medium über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Diese Übernachtskultur wurde auf eine  $OD_{600}$  von 0,05 in 20 ml frischem Medium verdünnt und bei 37°C schüttelnd bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,4 inkubiert. Diese Vorkultur wurde dann 1/10 in 18 ml frischem Medium verdünnt und die  $OD_{600}$  in regelmäßigen Intervallen gemessen bis eine bestimmte  $OD_{600}$  erreicht wurde. Agarplatten mit ausgestrichenen oder aufgetropften Kulturen wurden umgedreht bei 37°C in einem statischen Inkubator (Galenkamp, Economy incubator INA-305 series) inkubiert.

### 2.5.3 Kultivierung von *C. glutamicum*

Für Vorkulturen von *C. glutamicum*-Stämmen wurden stets 5 ml Vollmedium im Reagenzglas mit einer Einzelkolonie beimpft und 7-8 h schüttelnd inkubiert. Aus diesen Vorkulturen wurden je 10 ml Minimalmedium auf eine  $OD_{600}$  von 0,2-0,5 angeimpft und über Nacht inkubiert. Die Übernachtskulturen dienten zum Animpfen von Minimalmedium auf eine  $OD_{600}$  von 0,5 bis 1. Diese Kulturen wurden bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase inkubiert und für weitere Experimente verwendet. Die Kultivierung im Schüttelkolben erfolgte bei 30°C mit einer Schüttelfrequenz von 125 rpm. Es kamen 100-, 250-, 500-, und 2000-ml Schüttelkolben mit seitlichen Schikanen zum Einsatz, die mit 1/10 Kulturflüssigkeit befüllt wurden. Die Zelldichte wurde durch die Lichtstreuung bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ) bestimmt, wofür ein Spektrometer (Novaspec II; Pharmacia Biotech Inc. Uppsala, S) verwendet wurde. Anhand der gemessenen  $OD_{600}$  konnte durch die folgenden Korrelationen (Gleichung 3 und 4) auf die Biomassekonzentration (BTM) (g/l) und die Zellkonzentration ( $\mu\text{l}^{-1}$ ) geschlossen werden.

$$\text{Korrelation von BTM zu } OD_{600}: \quad \text{BTM} = 0,36 \text{ } OD_{600} \text{ (g/l)} \quad \text{(Gleichung 3)}$$

$$\text{Korrelation von Zellzahl zu } OD_{600}: \quad \text{Zellkonzentration} = 6,8 * 10^5 \text{ } OD_{600} \text{ (}\mu\text{l}^{-1}\text{)} \quad \text{(Gleichung 4)}$$

Für Wachstumsteste auf Festmedium wurden je 3-5 µl Kultur der exponentiellen Phase in verschiedenen Verdünnungen auf Agarplatten getropft, bei 30°C inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten fotografiert.

### 2.5.4 Kultivierung in Mikrotiterplatten

Die Kultivierung in Mikrotiterplatten erfolgte bei 30°C in 96-*well* Rotilab-Mikrosetplatten (Roth, Karlsruhe). Als Schüttler wurde der Titramax 101 (Heidolph, Schwabach) verwendet. Bei 3 mm Schütteldurchmesser betrug die Schüttelfrequenz 1200 rpm und das Kulturvolumen 200 µl pro *well*. Die Kulturen wurden auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1-0,5 angeimpft. Zur Vermeidung von Flüssigkeitsverlusten wurden die Platten mit einer gasdurchlässigen *Breathe-Easy*-Membran (DiversifiedBiotech, Boston, USA) abgedeckt. Die Zelldichte wurde anhand der Lichtstreuung bei einer Wellenlänge von 602 nm bestimmt, wofür das Plattenlesegerät VICTOR 1420 Multilabel Counter (Wallac, jetzt PerkinElmer in Wellesley, Massachusetts, USA) verwendet wurde. Anhand der empirisch ermittelten Korrelation (Gleichung 4) zu den OD<sub>600</sub>-Werten des Spektrometer Novaspec II wurden diese Werte für eine bessere Vergleichbarkeit mit Kultivierungen in Schüttelkolben in OD<sub>600</sub>-Werte umgerechnet (Gleichung 5).

Korrelation OD<sub>600</sub> zu OD<sub>Wallac</sub>:

$$OD_{600} = 3,02 OD_{Wallac}^3 - 0,86 OD_{Wallac}^2 + 3,12 OD_{Wallac} - 0,24 \quad (\text{Gleichung 5})$$

### 2.5.5 Batch-Fermentation im Bioreaktor

Zur Kultivierung im gerührten Bioreaktor dienten 2-Liter-Fermenter mit angeschlossener Biostat B-Reglereinheit (Sartorius BBI Systems, Melsungen). Die Temperaturregulation der Bakterienkultur wurde über einen wassergefüllten Außenmantel des Fermenters realisiert. Verschiedene Anschlussstutzen (DN19 und DN25) wurden für die Installation einer pO<sub>2</sub>-Sonde (Mettler Toledo, Gießen), einer Gelelektrolyt-pH-Elektrode (Mettler Toledo, Gießen) und einer Temperatursonde (Sartorius BBI Systems, Melsungen) benutzt. Die Zuluft wurde dem Bioreaktor durch einen 0,2 µm Sterilfilter des Typs Midisart2000 (Sartorius BBI Systems, Melsungen) zugeführt. Die Abluft wurde durch einen Kühler geleitet und ebenfalls sterilfiltriert. Zur Analyse der Zellen und des Reaktorinhalts wurden Proben durch Überdruck aus dem Bioreaktor mittels eines in 70% (w/v) Ethanol tauchenden Schlauchstücks steril entnommen. Bei sämtlichen Fermentationen betrug das Arbeitsvolumen 1,3 l. Die Temperatur wurde bei 30°C konstant gehalten. Um eine optimale Sauerstoffversorgung zu gewährleisten,

wurde eine Rührerdrehzahl von 1200 rpm und eine Begasungsrate von 1 vvm gewählt. Hiermit wurde der Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) stets über 30% Sättigung gehalten. Der pH-Wert der Kultur wurde durch automatische Zugabe von 15%  $H_2SO_4$  und 5 M NaOH auf einen gewünschten Wert zwischen pH 6 und pH 9 eingestellt. Für die Analyse des  $O_2$ - und  $CO_2$ -Gehalts in der Abluft wurde das Gerät URAS 10E (Hartmann & Braun, Ratingen) verwendet. Die Datenerfassung und die Datenverarbeitung erfolgten mit Hilfe des Softwarepaketes MFCS (Sartorius BBI Systems, Melsungen).

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

### 2.6.1 Präparation chromosomaler DNA aus *C. glutamicum*

Die *C. glutamicum*-Zellen wurden über Nacht in 5 ml BHI-Medium angezogen. Nach der Zentrifugation (4000 x g, 4°C, 10 min) wurden die Zellen in 3 ml der Lösung B1 (25 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 50 mM Glukose, 20 mg/ml Lysozym und 30 µg/ml RNase A) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 2 h bei 37°C wurden 400 µl 10%iger-SDS-Lösung zugegeben und vorsichtig mit den Zellen vermischt. Nach 2 min wurden 5 mg Proteinase K zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 3 ml einer Phenol:Chloroform:Isoamyl-Alkohol-Mischung (25:24:1) zugesetzt und durch Invertieren des Gefäßes mit dem Ansatz vermischt. Nach der Zentrifugation (4000 x g, 4°C, 4 min) wurden 2 ml des Überstandes in ein 15-ml-Röhrchen überführt und mit 3 ml absolutem Ethanol vermischt. Die ausgefällte DNA wurde durch Zentrifugation (4000 x g, RT, 25 min) pelletiert. Das DNA-Pellet wurde in 6 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (4000 x g, RT, 5 min). Schließlich wurde die ausgefällte DNA zunächst an der Luft getrocknet und dann in 300 µl  $H_2O$  gelöst.

### 2.6.2 Konzentrationsbestimmung der DNA

Mit Hilfe des Photometers (Novaspec II, Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Schweden) wurde eine Konzentrationsbestimmung der in Wasser gelösten DNA durchgeführt. Dazu wurde die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen. Der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  gibt die Verunreinigung der Probe mit Proteinen an. Er sollte im Bereich zwischen 1,8 und 2,3 liegen. Die Konzentration der DNA in der Lösung wurde nach Gleichung 6 ermittelt.

V = Verdünnungsfaktor

F = Multiplikationsfaktor (50 für dsDNA)

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = A_{260} * V * F \quad \text{(Gleichung 6)}$$

### 2.6.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion konnten spezifische DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten Oligonukleotidabschnitten flankiert waren, mittels der temperaturstabilen *Taq*-Polymerase oder der *Phusion*-Polymerase exponentiell vermehrt werden. Der Reaktionsansatz enthielt die jeweilige Polymerase, die zu amplifizierende doppelsträngige DNA-Zielsequenz (0,1-0,5 µg), Primer (jeweils 10 pmol), dNTP's und Mg<sup>2+</sup>-Ionen. Die PCR wurde im Thermocycler Mastercycler<sup>®</sup>-gradient (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Das Standard-Amplifizierungsprogramm umfasste folgende Schritte: Einer 5-minütigen Initialdenaturierung bei 94°C folgten 30 Zyklen der eigentlichen Amplifizierung. Jeder Zyklus begann mit einer Denaturierungsphase von 30 s bei 94°C. Es folgte das *annealing* der Primer bei der entsprechenden Temperatur und zuletzt wurde das Fragment amplifiziert, wobei pro kb 1 min, bzw. 30 s berechnet wurden. Im Anschluss folgte ein 5-minütiger Schritt bei 72°C, woraufhin der Reaktionsansatz auf 4°C abgekühlt wurde.

### 2.6.4 Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Präparation von DNA und für Restriktionsanalysen wurde die DNA in 1%igen TAE-Agarosegelen (40 mM Tris-Acetat, 2 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,8) aufgetrennt (Sambrook *et al.*, 1989). Die Spannung bei der elektrophoretischen Auftrennung betrug 5 V/cm. Die Proben wurden mit einem 6 x Gel-Beladungspuffer (0,25 % Bromphenol Blau, 40% (w/v) Saccharose in Wasser) 1:5 vermischt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente in der Regel der Lambda DNA/*Eco*911-(*Bst*Ell)-Marker 15 (MBI Fermentas, Vilnius), von dem ca. 5 µl aufgetragen wurden. Die DNA wurde bei Bedarf mit Hilfe des Kits NucleoSpin Extract (Macherey & Nagel, Düren) nach der Anleitung der Hersteller aus dem Agarosegel isoliert und in 15 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

### 2.6.5 Plasmidpräparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit Hilfe des „Nucleo-Spin Plasmid Quick Pure Kits“ (Macherey & Nagel, Düren) durchgeführt. Diese Methode kombiniert die alkalische Lyse der Bakterienzelle mit der Aufreinigung der Plasmid-DNA durch Bindung an eine Kieselgel-Membran, die sich in einer kleinen Säule befindet. Bei *C. glutamicum* wurden in 500 µl Puffer P1 zusätzlich 15 mg/ml Lysozym hinzugefügt und 20 min bei 37°C inkubiert. Die Elution erfolgte in 30-50 µl H<sub>2</sub>O.

### 2.6.6 Ligation und Spaltung von Plasmiden und PCR-Fragmenten

Der enzymatische Verdau von DNA wurde durch Restriktionsendonukleasen der Firmen New England Biolabs (Frankfurt/Main) oder MBI Fermentas (St. Leon-Roth) in den mitgelieferten Puffern durchgeführt. Plasmid-DNA wurde mit 1-2 Units/ $\mu\text{g}$  DNA mindestens 2 h verdaut. Mittels der T4-DNA-Ligase wird eine Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe des einen DNA Fragments und der 3'-OH-Gruppe des anderen Endes geschlossen. Zur Klonierung von PCR-Fragmenten in den Vektor pDrive® der Firma Qiagen (Hilden) wurde diese nach gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließender Extraktion aus dem Gel mit den bereits linearisierten Vektoren ligiert. Die linearisierten Vektoren besitzen 3'-terminale Thymin-Überhänge. Bei der PCR von DNA-Fragmenten entstehen bei Verwendung der *Taq*-Polymerase 3'-Adenin-Überhänge, so dass eine Ligation der Vektoren und der PCR-Fragmente möglich war. Die Ligation erfolgte in einem Reaktionsansatz mit 2 x Ligationspuffer und T4-DNA-Ligase (Promega, USA) bei RT für 2 h. Insert und linearisiertes Plasmid wurden im Verhältnis 3:1 in den Ligationsansatz gegeben.

### 2.6.7 Ortsgerichtete Mutagenese

Zur Konstruktion der einzelnen Mutanten wurde eine Methode in Anlehnung an das „QuickChange Site-Directed-Mutagenesis-Kit“ der Firma Stratagene verwendet. Hierzu wurde eine PCR-ähnliche Reaktion mit der Phusion-DNA-Polymerase (Qiagen) durchgeführt, wobei die mutationstragenden Oligonukleotide als Primer und der methylierte Vektor als Matrize dienten (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988). Daraufhin wurden die methylierten Matrizenstränge mit *DpnI* verdaut und die verbliebenen linearen PCR-Produkte, in den Stamm *E. coli* DH5 $\alpha$ mc $r$  transformiert. In den Zellen wurden die *nicks* durch zelleigene Ligase verbunden und das auf diese Weise wiederhergestellte Plasmid amplifiziert. Die erfolgreiche Mutagenese wurde durch Sequenzierung der Sequenz im Bereich des jeweiligen Basenaustausches überprüft.

### 2.6.8 DNA-Sequenzanalyse

Die DNA Sequenzierung erfolgte über GATC Biotech (Konstanz). Dazu wurden 150 ng DNA, sowie 3-10 pmol entsprechende Primer benötigt. Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe der Software Chromas Version 1.45 und dem Sci. Ed. Central-Paket, das die Software Clone Manager, Align Plus und Primer Design umfasst, analysiert und bearbeitet. Zudem konnten mit der Software die Synthese von Oligonukleotide geplant werden.

## 2.6.9 Transformation von *E. coli*

### 2.6.9.1 Hitzeschock

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach der Methode von Sambrook *et al.* (1989) hergestellt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die Transformation wurden die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut und die Fremd-DNA hinzugegeben. Der Ansatz wurde auf Eis mindestens 0,5 h inkubiert, bevor die Zellen einem Hitzeschock von  $42^{\circ}\text{C}$  für 1 min ausgesetzt wurden. Anschließend wurden 800  $\mu\text{l}$  LB-Medium hinzugefügt und der Ansatz wurde bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 45 min inkubiert. Die Selektion der vektortragenden Zellen erfolgte durch das Ausstreichen auf antibiotikahaltigen Agarplatten bzw. Blau-Weiß-Selektion (Abschnitt 2.6.11.).

### 2.6.9.2 Variation $\text{CaCl}_2$ Hitze-Schock

Eine Übernachtskultur des Stammes, der transformiert werden soll (LB,  $37^{\circ}\text{C}$ , 400 rpm), wurde 1/100 in frischem LB-Medium inokuliert und bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,6 kultiviert. 1 ml dieser Kultur wurde geerntet (1 min, 14000 rpm, RT, Jouan A14 ultracentrifuge) und die Zellen in 0,5 ml eiskaltem  $\text{CaCl}_2$  (50 mM) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut geerntet und in 0,3 ml eiskaltem 50 mM  $\text{CaCl}_2$  resuspendiert und auf Eis 30 min inkubiert. 0,5 ml Plasmid DNA oder 10 ml *site-directed* Mutagenese Produkt wurde zu den Zellen gegeben und die Mischung wurde weitere 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde ein Hitzeschock bei  $42^{\circ}\text{C}$  für 2 min im Wasserbad durchgeführt, 1 ml LB-Medium hinzugefügt und für 1 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Zellen wurden erneut geerntet und in 100  $\mu\text{l}$  LB-Medium resuspendiert. 50  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden dann auf einer Platte mit selektivem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Transformierte Zellen sind dann auf einer frischen antibiotikahaltigen Platte vereinzelt worden.

## 2.6.10 Transformation von *C. glutamicum*

Elektrokompetente Zellen von *C. glutamicum* wurden nach Liebl *et al.* (1989) hergestellt. Dazu wurden 100 ml LB-Medium mit Wachstumsinhibitoren (4 g/l Isonicotinsäurehydrazid, 25 g/l Glycin und 1 g/l Tween-80) in einem 2 l-Kolben mit einer *C. glutamicum*-Vorkultur, bei der die Zellen über Nacht bei  $30^{\circ}\text{C}$  in BHI-Medium inkubiert wurden, auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,3 angeimpft. Die Inkubation dieser Kultur erfolgte bei RT mit 200 rpm schüttelnd über Nacht. Am nächsten Morgen wurden die Zellen nach 10 minütiger Inkubation auf Eis bei

4500 rpm, 4°C, 10 min geerntet, um dann viermal in eiskaltem 10%igen Glycerin gewaschen und anschließend in 1 ml einer 1%igen Glycerin-Lösung resuspendiert zu werden. Die Zellen wurden anschließend zu 50 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Diese konnten dann bei -80°C bis zur Transformation aufbewahrt werden. Für die Elektroporation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit 3-8 µl Plasmid-DNA vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 2 mM Elektrodenabstand (peQLab, Erlangen) überführt. Daraufhin wurden die Zellen in einem Gene-Pulser (Biorad) durch einen Elektropuls von 2,5 kV bei 600 Ω Parallelwiderstand und 25 µF Kapazität elektroporiert. Sofort nach dem Puls wurde mit BHIS-Medium (BHI-Medium mit 0,5 M Sorbitol) auf 1 ml aufgefüllt. Der Inhalt der Küvette wurde danach in ein 2 ml-Eppendorf-Gefäß überführt und für 6 min bei 46°C inkubiert. Die Zellen wurden dann 90-120 min bei 30°C schüttelnd inkubiert und auf BHI Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen.

### **2.6.11 Blau-Weiß-Selektion rekombinanter *E. coli*-Klone**

Bei der Klonierung von Fragmenten in den Vektoren pDrive war es möglich, positiv rekombinante Klon-Kolonien auf den Agarplatten zu selektieren, wenn der Agarplatten vor der Ausplattierung 10 µl IPTG (1 M) als Laktose-Analogon und 40 µl X-Gal (40 mg/ml in 2%igem DMFO) hinzugefügt worden war. Das Plasmid trägt die Sequenz für den N-terminalen Bereich der β-Galactosidase, das *lacZ*-Genprodukt, in der *multiple cloning site* welcher zusammen mit dem C-terminalen Bereich, der von *E. coli* DH5α-Zellen exprimiert wird, ein enzymatisch aktives Protein bildet. Die Aktivität der β-Galactosidase führt zur Spaltung des Induktors X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid) und Blaufärbung der Kolonie. Ist das *lacZ*-Gen durch die Insertion eines Fragmentes unterbrochen, wird keine aktive β-Galactosidase gebildet und die Kolonien bleiben weiß.

### **2.6.12 Konstruktion von Insertionsmutanten**

Insertionsmutanten von *C. glutamicum* wurden konstruiert, um Gene spezifisch zu unterbrechen. Es wurden zunächst Primer verwendet, die innerhalb des Gens *circa* 100 bp vom Anfang und vom Ende entfernt binden können. Nach einer PCR wurde das entstandene Fragment in den Vektor pDrive ligiert, der ein Kanamycin-Resistenzgen enthält. Nach der Amplifikation des Vektors in *E. coli* wurden elektrokompente *C. glutamicum*-Zellen durch das Plasmid transformiert. Durch homologe Rekombination wurde das Fragment mit dem Plasmid in das Genom der Zelle inseriert. Die Sequenz des Gens war durch das Plasmid

unterbrochen und begann hinter dem Plasmid wieder mit den Basen des ursprünglichen PCR-Fragments, jedoch ohne Startcodon. Damit war das Gen nicht mehr lesbar und es konnte kein entsprechendes Protein synthetisiert werden. Zellen des Insertionsstammes mussten immer in Anwesenheit des entsprechenden Antibiotikums kultiviert werden, da die Insertion reversibel ist.

## **2.7 Biochemische Techniken**

### **2.7.1 Bestimmung der internen und externen Kaliumkonzentration**

Die Kaliumkonzentrationen wurden mittels Atomemissionspektrometrie (Flammenphotometer ELEX 6361, Eppendorf Hamburg) bestimmt (max.  $K^+$ -Konzentration im Medium: 5 mM). Zur Standardisierung wurden Eichlösungen (50 und 300  $\mu$ M KCl) verwendet. Die Messungen erfolgten ohne den Einsatz eines Leitlinienelements bei einer 5,997fachen Verstärkung des Kaliumsignals. Die Proben wurden bei einer Kaliumkonzentration von über 300  $\mu$ M mit  $H_2O$  verdünnt und nochmals vermessen. Für die Bestimmung des internen Kaliumgehalts wurde von der Kultur die  $OD_{600}$  bestimmt und 1,8 ml geerntet (30 s, 14000 rpm, 30°C) und der Überstand und das Zellpellet vermessen. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von 1,8 ml destilliertem Wasser, anschließender Inkubation im Ultraschallbad bei 85°C für 20 min und anschließender Vermessung des Überstandes. Es wurde ein Innenvolumenumrechnungsfaktor von 2  $\mu$ l/mg<sub>BTM</sub> verwendet.

### **2.7.2 Messung der Kaliumaufnahme (Institute Of Medical Sciences, IMS Aberdeen)**

Für die Messung der Kaliumaufnahme von Zellen wurde eine kaliumionenselektive Elektrode (ELIT 8031) (Nico2000, London, UK) verwendet, die über eine Festkörper PVC-Polymer Matrix-Membran  $K^+$ -Ionen über die Messung von Spannungen detektieren kann, wobei eine  $Li^+$ -Elektrode als Referenz-Elektrode fungiert. Dazu wurden 5 ml Zellen aus einer Übernachtskultur in  $K_{30}$ -Medium in 40 ml vorgewärmtes  $K_{30}$ -Medium verdünnt ( $OD_{650}=0,1-0,2$ ) und bis zu einer  $OD_{650}$  von 0,4 kultiviert, woraufhin durch die Zugabe von 1 mM IPTG für eine 1 h die Genexpression induziert wurde. Geerntet wurden die Zellen durch Zentrifugation bei RT, 4400 rpm, 10 min und anschließend in 1,4 ml vorgewärmtem 0,12 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) resuspendiert und bei 37°C, 2 min, 400 rpm inkubiert. Dann wurde 1 mM NaEDTA hinzugefügt und weitere 10 min, 37°C, 400 rpm inkubiert. Schließlich wurden die Zellen durch die Zugabe von 5,6 ml Tris-HCl (pH 8,0) um ein fünffaches

verdünnt und geerntet (4400 rpm, RT, 10 min). Daraufhin folgten zwei Waschungen mit 35 ml K<sub>0</sub> (pH 7,0) und die anschließende Resuspension in 5 ml K<sub>0</sub>, Bestimmung der OD<sub>650</sub> und Lagerung auf Eis. Vor dem Beginn einer Messung wurde die K<sup>+</sup>-Elektrode für 24 h in einer 1000 ppm (26 mM) KCl-Lösung gelagert und mit einer Vier-Punkt-Eichung (100, 200, 300 und 500 µM KCl) kalibriert. Die Zellen wurden 2 min, 37°C, 200 rpm aufgewärmt und in 35 ml K<sub>0</sub>-Medium, das kontinuierlich auf 37°C gewärmt wurde, überführt und für weitere 10 min inkubiert. Daraufhin wurden 17,5 µl einer 1 M-KCl-Lösung (Endkonz.: 500 µM) hinzugefügt und 5 min rührend inkubiert. Dann wurden 18 µl einer 40%igen Glukose-Lösung (Endkonz.: 1 mM) hinzugefügt und weitere 10 min inkubiert. Währenddessen wurde der Kaliumgehalt der Kultur kontinuierlich mit Hilfe der Elektrode dokumentiert.

### **2.7.3 Bestimmung der internen Calciumkonzentration in *C. glutamicum***

Die Bestimmung der internen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in *C. glutamicum*-Zellen wurde mittels Atomabsorptionsspektrometrie am Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene in Köln durchgeführt. Dazu wurden die Zellen über acht Stunden in Minimalmedium bei unterschiedlichen pH-Werten kultiviert und bezogen auf die gemessene End-OD<sub>600</sub> der interne Calciumgehalt, ermittelt.

### **2.7.4 Membranpotential Messungen von *E. coli***

Zur Messungen der Änderung des Membranpotentials von *E. coli*-Zellen wurde der Fluoreszenzfarbstoff DiSC<sub>3</sub>(5) (3,5-dipropylthiadicarbocyanine) (Molecular Probes) verwendet. Dazu wurden die *E. coli*-Zellen in K<sub>30</sub>-Medium vorkultiviert, von OD<sub>600</sub>=0,05 bis 0,4 erneut in K<sub>30</sub>-Medium kultiviert, und dann für weitere 2 h mit 1 mM IPTG induziert. Die exponentiell-wachsenden *E. coli*-Zellen wurden dann mit 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) bei RT zweimal gewaschen und im gleichen Puffer auf eine OD<sub>600</sub> von 10 inokuliert. Daraufhin wurden die Zellen mit 1 mM EDTA für 90 s bei 35°C inkubiert und im Anschluss um das fünffache des Volumens mit 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) verdünnt. Nach einem Waschschrift mit K<sub>0</sub>-Medium wurden die Zellen auf eine OD<sub>600</sub> von 1 in K<sub>0</sub>-Medium resuspendiert und auf Eis gelagert. Die Messungen erfolgten in 2 ml-Küvetten bei 37°C im Fluorimeter, wobei die Anregung bei 650 nm (Bandpass: 8) und die gemessene Emission bei 670 nm (Bandpass: 4) lagen. Die gewählte Verstärkung betrug 835 V. Hierzu wurden 200 µl Zellen (OD<sub>600</sub>=0,1) mit 5 mM Glukose energetisiert und 0,2 µM DiSC<sub>3</sub>(5)-Farbstoff hinzugefügt. Nach Stabilisierung

des Messignals aufgrund der Farbstoffaufnahme in die Zellen, die durch das Membranpotential bestimmt wird, wurden dem Ansatz 150 mM KCl hinzugefügt.

### 2.7.5 Bestimmung des cytoplasmatischen pH-Wertes von *C. glutamicum*

Der pH-Gradient wurde durch die Bestimmung der Verteilung einer schwachen Säure bzw. einer schwachen Base über die Zellmembran berechnet (Rottenberg, 1979 und Kashket, 1985). Die Methode basiert auf der Annahme, dass die Membran für die jeweilige neutrale Form frei permeabel, für das Ion jedoch undurchlässig ist. Für den Fall, dass der interne pH-Wert über dem externen lag, wurde [<sup>14</sup>C]-markierte Benzoesäure als Sonde eingesetzt. Unter der Annahme, dass die Säure innerhalb und außerhalb der Zelle die gleiche Dissoziationskonstante ( $pK_s \sim 4,2$ ) aufweist und die ionisierte Form unter den gegebenen Bedingungen ( $pH_{ex} > pK_s + 1$ ) den weitaus größten Anteil stellt, kann von der Gesamtverteilung der Benzoesäure (nur die Gesamtkonzentrationen sind der Messung zugänglich) direkt mittels Gleichung 7 auf die Verteilung des Benzoats geschlossen und der pH-Gradient berechnet werden.

Bestimmung des pH-Gradienten bei  $pK_s + 1 < pH_{ex} < pH_{in}$  :

$$\Delta pH = pH_{in} - pH_{ex} = \log ([Beenzoat]_{in} / [Benzoat]_{ex}) \quad (\text{Gleichung 7})$$

Wenn der externe pH-Wert nicht um mindestens eine Einheit größer als der  $pK_s$ -Wert der Sonde war, befand sich ein signifikanter Anteil der Säure in der undissoziierten Form und konnte nicht vernachlässigt werden. Hier ergab sich der interne pH-Wert aus Gleichung 8.

Bestimmung des pH-Gradienten bei  $pK_s + 1 > pH_{ex} < pH_{in}$  :

$$pH_{in} = \log ([Benzoessäure_{total}]_{in} / [Benzoessäure_{total}]_{ex} (10^{pK_s} + 10^{pH_{ex}}) - 10^{pK_s}) \quad (\text{Gleichung 8})$$

Zur Bestimmung der intra- und extrazellulären Benzoatkonzentration wurden 0,7 ml Aliquots von Zellsuspensionen der exponentiellen Phase bei einer  $OD_{600}$  von 3 bis 5 mit 20  $\mu$ l einer Gebrauchslösung der markierten Sonde 1 min bei 30°C unter Rühren inkubiert. Dieser Testansatz (0,72 ml) enthielt dann ca. 15  $\mu$ M [<sup>14</sup>C]-markierter Benzoesäure (spezifische Aktivität der Gebrauchslösung: 3,12 mCi/mmol) und zwischen 0,75 und 1,25 mg BTM. Die Zellen wurden anschließend durch Silikonölzentrifugation vom Medium getrennt und die Überstände und die Sedimente wurden für die Bestimmung der internen und externen Benzoatkonzentrationen aufgearbeitet. Unabhängig vom pH-Gradienten bindet die Sonde auch unspezifisch an der Zelloberfläche und im Zellinneren. Daher wurde zur Korrektur die

Bestimmung der internen Benzoatkonzentration auch mit Zellen durchgeführt, die zuvor mit 50  $\mu\text{M}$  Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP) deenergetisiert worden waren. Der so ermittelte Wert für die unspezifisch gebundene interne Benzoat-Menge wurde von dem entsprechenden Wert der unbehandelten Zellen abgezogen. Mit Hilfe der parallel durchgeführten Volumenbestimmungen konnten schließlich die interne Benzoatkonzentration und der pH-Gradient nach den oben angegebenen Formeln berechnet werden.

Für den Fall, dass der interne pH-Wert unter dem externen lag, wurde [ $^{14}\text{C}$ ]-markiertes Methylammonium ( $\text{pK}_\text{S} = 10,65$ ) als Sonde verwendet. Aus denselben Überlegungen wie bei der Benzoesäure kann der pH-Gradient mit Hilfe der Gleichungen 9 und 10 berechnet werden.

Bestimmung des pH-Gradienten bei  $\text{pK}_\text{S} - 1 > \text{pH}_\text{ex} > \text{pH}_\text{in}$  :

$$\Delta\text{pH} = \text{pH}_\text{in} - \text{pH}_\text{ex} = \log \left( \frac{[\text{Methylammonium}^+]_\text{in}}{[\text{Methylammonium}^+]_\text{ex}} \right) \quad (\text{Gleichung 9})$$

Bestimmung des pH-Gradienten bei  $\text{pK}_\text{S} - 1 < \text{pH}_\text{ex} > \text{pH}_\text{in}$  :

$$\text{pH}_\text{in} = -\log \left( \frac{[\text{Methylammonium}^+]_\text{in}}{[\text{Methylammonium}^+]_\text{ex}} \left( 10^{-\text{pK}_\text{S}} + 10^{\text{pH}_\text{ex}} \right) - 10^{-\text{pK}_\text{S}} \right) \quad (\text{Gleichung 10})$$

Die Bestimmung der intra- und extrazellulären Methylammoniumkonzentrationen erfolgte wie oben beschrieben (15  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-markiertes Methylammonium Endkonzentration bei einer spezifischen Aktivität der Gebrauchslösung von 3,3 mCi/mmol). Allerdings wurde zur Bestimmung der unspezifischen Bindung Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) in einer Endkonzentration von 0,022% verwendet, da CCCP bei alkalischen pH-Werten in seiner Wirkung zu langsam ist.

### 2.7.6 Bestimmung des Membranpotentials von *C. glutamicum*

Zur Bestimmung des elektrischen Potentials über der Cytoplasmamembran wurde das [ $^{14}\text{C}$ ]-markierte lipophile Kation  $\text{TPP}^+$  als Sonde eingesetzt (Rottenberg, 1979; Kashket, 1985). Diese Sonde kann die Cytoplasmamembran durchdringen und wird in Anwesenheit eines elektrischen Potentials in der negativ geladenen Zelle bis zur Gleichgewichtseinstellung akkumuliert. Im Gleichgewicht entspricht das chemische Potential der Sonde dem elektrischen Potential über der Membran. Daher kann das elektrische Potential mit Hilfe der experimentell bestimmbareren intra- und extrazellulären Sondenkonzentration nach Gleichung 11 berechnet werden.

$$\Delta\Psi = (-2,3 R * T / F) \log \left( \frac{[\text{TPP}^+]_\text{in}}{[\text{TPP}^+]_\text{ex}} \right)$$

F = Faraday'sche Konstante ( $9,6 * 10^4 \text{ A s mol}^{-1}$ )

R = allgemeine Gaskonstante ( $8,31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )

T = absolute Temperatur in Kelvin

(Gleichung 11)

Zur Bestimmung der intra- und extrazellulären Sondenkonzentrationen im Gleichgewicht wurden 1,0 ml Aliquots von Zellsuspensionen der exponentiellen Phase bei einer  $OD_{600}$  von 3-5 mit 10  $\mu$ l einer Gebrauchslösung der markierten Sonde 1 min bei 30°C rührend inkubiert. Dieser Testansatz (1,01 ml) enthielt dann ca. 5  $\mu$ M [ $^{14}$ C]-markiertes  $TPP^+$  (spezifische Aktivität der Gebrauchslösung: 0,995 mCi/mmol) und zwischen 0,75 und 1,25  $mg_{BTM}$ . Die Trennung der Zellen vom Medium erfolgte durch Silikonölzentrifugation. Da hierbei ein Teil des unspezifisch an die Zellen gebundenen  $TPP^+$  in der Ölphase verbleibt, wurden nicht die Aktivität in der Pelletfraktion, sondern die Aktivitäten im Gesamtansatz (Zellsuspension vor dem Zentrifugationsschritt) und im Überstand gemessen. Die in der Pelletfraktion befindliche  $TPP^+$ -Menge ergab sich aus der Differenz zwischen der  $TPP^+$ -Menge im Gesamtansatz und der im Überstand ( $TPP^+_{\text{Pellet}} = TPP^+_{\text{gesamt}} - TPP^+_{\text{Überstand}}$ ). Zur Korrektur des unspezifisch an anionische Gruppen auf der Zelloberfläche und im Zellinneren gebundenen  $TPP^+$  wurde diese Bestimmung auch mit Zellen durchgeführt, die durch einen Ionophorenmix aus Valinomycin (Endkonz.: 20  $\mu$ M) und Nigericin (Endkonz.: 5  $\mu$ M) deenergetisiert worden waren.

### 2.7.7 Bestimmung der protonenmotorischen Kraft (PMK) von *C. glutamicum*

Die Bestimmungen des Membranpotentials und des pH-Gradienten über die Cytoplasmamembran ermöglichten die Berechnung der PMK nach Gleichung 12.

$$PMK = \Delta\Psi - z * \Delta pH$$

PMK = Protonenmotorische Kraft (mV)

$\Delta\Psi$  = Membranpotential (mV)

$$z = 2,3 R * T / F \sim 61 \text{ mV bei } 30^\circ\text{C}$$

(Gleichung 12)

### 2.7.8 Bestimmung der Atmungsaktivität

Der  $O_2$ -Verbrauch von *C. glutamicum*-Zellen wurde mittels einer Clark-Typ-Sauerstoffelektrode (Oxygraph, Hansatech, Reutlingen) bei 30°C in 1 ml kaliumfreien Minimalmedium (pH 6,0) bestimmt. Nach Vorkultivierung in kaliumfreien Minimalmedium bis in die exponentielle Phase wurden die Zellen auf eine  $OD_{600}$  von 0,3-0,5 verdünnt. Nach fünfminütiger Inkubation konnten konstante Raten an  $O_2$ -Verbrauch bestimmt werden. Daraufhin wurde 50 mM KCl hinzugefügt und je nach Ansatz nach erneuter fünfminütiger Inkubation 20  $\mu$ M Valinomycin. Die Datenerfassung und -auswertung erfolgte mit Hilfe der Software OXYGRAPH V1.10 (Hansatech, England).

### 2.7.9 HPLC-Analyse zur Bestimmung von L-Lysin und L-Glutamat

Um die externen Konzentrationen an L-Lysin im Medium zu bestimmen, wurden 1 ml Aliquots mit bekannter OD<sub>600</sub> 20 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Bestimmung von L-Lysin in den zellfreien Überständen erfolgte mit Hilfe der HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Zur Bestimmung der internen Glutamatkonzentration von *C. glutamicum*-Zellen wurden 1 ml Zellen mit bekannter OD<sub>600</sub> pelletiert und das Zellpellet in 120 µl H<sub>2</sub>O and 100 µl Solikonöl ( $\delta=1,04$ ) (Wakker Chemie AG, Burghausen) resuspendiert. Durch 15 minütige Ultraschallbehandlung wurden die Zellen aufgeschlossen und nach Zentrifugation (13000 rpm, 20 min, 4°C) der Überstand vermessen. Es wurde eine HPLC-Anlage HP 1100 (Hewlett-Packard, Waldbronn) mit angeschlossenem Fluoreszenzdetektor der Serie HP 1100 verwendet. Das in den Proben enthaltene L-Lysin, bzw. L-Glutamat wurde der automatischen Vorsäulenderivatisierung mit 10-fachem Überschuss an o-Phtaldialdehyd/Borat/2-Mercaptoethanol-Reagenz (Pierce Europe, B. V. Oud-Beijerland, NL) unterzogen. Dabei wurden primäre Aminosäuren zu fluoreszierenden thiosubstituierten Isoindolen derivatisiert (Lindroth und Mopper, 1979), deren Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 455 nm detektiert werden kann. Die Auftrennung erfolgte über eine *reversed phase*-Säule RP-18 (Vorsäule Multospher: 40 x 4 mM, CS Chromatographie, Langerwehe; Trennsäule Nucleodur RP-18: 125 x 4 mM, Macherey & Nagel, Düren) bei 35°C und einem Fluss von 0,8 ml/min. Als mobile Phase wurde eine Mischung aus Puffer A (50% Methanol, 50% Acetonitril) und Puffer B (95% 40 mM Na<sup>+</sup>-Acetatpuffer pH 6,5 mit 0,06% Na<sup>+</sup>-Azid; 5% Puffer A) verwendet. Die Mischung wurde gemäß eines Gradientenprogrammes während des Laufs von 100% auf 0% Puffer A geändert. Durch eine automatisch ermittelte Kalibrierungsreihe von sechs definierten L-Lysin und L-Glutamatkonzentrationen (20, 50, 100, 200, 500 und 1000 µM) konnten die *Peak*-Flächen der Proben direkt in die entsprechende Konzentration umgerechnet werden.

### 2.7.10 RNA-Isolierung und -Hybridisierung (Northern Blot)

*C. glutamicum*-Zellen wurden kaliumgehungert und von OD<sub>600</sub>=2 bis OD<sub>600</sub>=5 kultiviert. Daraufhin wurden 0,75 M NaCl den Kulturen in An- und Abwesenheit von 10 mM KCl hinzugefügt, so dass die externe Osmolalität von 300 auf 1309 mosmol/kg gesteigert wurde. Für die Aufreinigung der RNA wurden Zellen vor dem osmotischen Schock, sowie 30 min und 60 min danach geerntet. 1 ml der Kultur wurden dazu bei 30°C, 13000 rpm, 1 min

sedimentiert und in Puffer RAI (Macherey & Nagel, Düren) resuspendiert. Daraufhin wurde die Zellen mit 300 mg Glaskugeln (Durchmesser 0,1-0,25 mM) durch drei Läufe je 30 s bei 6,5 m/s in der FastPrep120 (Q-Biogene, Heidelberg) aufgeschlossen. Die RNA wurde nach der Anleitung des Kits „Nucleospin-RNAII“ (Macherey & Nagel, Düren) aufgereinigt. Die Digoxigenin-markierten RNA-Antisense-Sonden wurden nach Möker *et al.*, 2004 synthetisiert. Jeweils 3 µg der Gesamt-RNA wurden mittels einer Minifold-Slot-Blot Apparatur (Schleicher und Schuell) auf eine Nylonmembran übertragen. Dabei wurde die RNA auf die Membran über eine Vakuumanlage (15 mbar) übertragen und durch ultraviolette Strahlung (125 J/cm<sup>2</sup>) fixiert. Die Hybridisierung und Detektion der Sonden erfolgte nach der Anleitung „DIG application manuel“ (Roche Applied Science). Die Chemiluminescence wurde mittels eines Fuji Analyzers LAS1000 (Raytest, Traubenhardt) detektiert.

## 2.8 Proteinbiochemische Methoden

### 2.8.1 Proteinsynthese

Die Proteinsynthese erfolgte durch die Induktion der Genexpression von *E. coli*- oder in *C. glutamicum*-Zellen mit einem Expressionsplasmid. Die Vorkultivierung der *E. coli*-Mutanten erfolgte aus einem Dauerstock über Nacht in 1/10 ml der Expressionskultur in LB-Medium bei 37°C. Daraufhin wurde LB-Medium mit der Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1-0,3 inokuliert und bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,8-1,0 kultiviert, bis durch die Zugabe von 0,5-1 mM IPTG induziert wurde. Nach ca. 3-5 h wurden die Zellen zentrifugiert (20-30 min, 4000 rpm, 4°C) und bei -80°C gelagert. Als Expressionskontrollen wurden 10 ml der Kultur nicht induziert und in unterschiedlichen Zeitabständen, jeweils 1 ml abgenommen, zentrifugiert (1 min, 4000 rpm, 4°C), das Pellet in 50 µl H<sub>2</sub>O und 30 µl 4 x Protein-Probenpuffer pro OD<sub>600</sub>=1 resuspendiert und in einem Proteingel zur Analyse aufgetrennt. In *C. glutamicum* wurde die Expression durch Zugabe von 0,5-1 mM IPTG entweder in Minimal- oder in Vollmedium über acht Stunden induziert.

### 2.8.2 Proteinextraktion

Alle Proteinarbeiten erfolgten unter ständiger Kühlung auf Eis. Zur Gewinnung cytoplasmatischer Proteine wurde das entsprechende Zellpellet in einem Aufschlusspuffer (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 100 mM KCl, 5 µg/µl DNase) resuspendiert. Um einen proteolytischen Abbau in den Zellextrakten zu verhindern, wurde Protease-Inhibitor

„Complete EDTA-frei“ (Roche Diagnostics, Mannheim,) zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte bei kleinen Ansätzen im FastPrep-Gerät FP120 (QBiogene, Heidelberg), wobei die Zellen viermal 30 s bei 6,5 m/s in Aufschlussgefäßen mit 300 mg Glasperlen ( $\varnothing$  0,2-0,3 mm) geschüttelt wurden. Der Rohextrakt wurde anschließend bei 12500 rpm, 4°C, 45 min zentrifugiert, um nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer abzutrennen.

### 2.8.3 Membranpräparation

Zur Membranpräparation wurden 35 ml vorgewärmtes LB/LK-Medium mit einer *E. coli*-selektiven Übernachtskultur auf eine Start OD<sub>650</sub> von 0,05 inokuliert und bis zu einer OD<sub>650</sub> von 0,4 kultiviert. Daraufhin wurde eine 1/12 Verdünnung in 60 ml frischem LB/LK-Medium inokuliert und bei einer OD<sub>650</sub> von 0,4 durch die Zugabe von 0,03 mM IPTG für 30 min die Genexpression induziert. Daraufhin wurde erneut die OD<sub>650</sub> bestimmt und 50 ml der Zellen geerntet 4000 rpm; 4°C; 10 min (Jouan MR22i Zentrifuge, SWM180.5 Rotor). Das Zellpellet wurde in 5 ml eiskaltem PBS-Puffer mit Protease-Inhibitor resuspendiert und in einer *FRENCH*<sup>®</sup> *pressure cell press* (SLM instruments Inc.) mit 180000 Psi aufgebrochen. Die Zelltrümmer wurden dann durch Zentrifugation 4000 rpm, 4°C entfernt und 3 ml des Überstands in einer Ultrazentrifuge (Beckman TL-100 Ultrazentrifuge; Rotor TLA 100.4) für 1 h, 50000 rpm bei 4°C sedimentiert. Das Membranpellet wurde dann in 125 µl PBS-Puffer mit Protease-Inhibitor resuspendiert und der Überstand mit den löslichen Proteine jeweils bei -20°C gelagert.

#### PBS-Puffer (1 l)

NaCl	140 mM
KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM

(autoklaviert, Lagerung bei RT)

### 2.8.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmungen wurden nach Bradford (1976), Lowry *et al.*, (1951) oder mit *Amido Black* nach Schaffner und Weissmann (1973) durchgeführt. Zur Herstellung von Eichgeraden diente Rinderserumalbumin (BSA).

### **2.8.5 Eindimensionale Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur Bestimmung der relativen Molekülmasse von Proteinen wurden sie elektrophoretisch 10%-15%-igen SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) (Lämmli, 1970) in vertikalen Proteingel-Apparaturen „Minigel-Twin“ (Biometra, Göttingen) aufgetrennt. Je nach weiterem Verwendungszweck wurden die Gele anschließend einer Coomassie-Färbung oder einem Western Blot unterzogen.

### **2.8.6 Coomassie-Färbung**

SDS-PAGEs wurden nach der Elektrophorese mit Coomassie gefärbt (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurde das Gel 1 h in einem Gemisch von 45% Methanol, 10% Essigsäure und 0,2% Coomassie Brilliant Blue G-250 inkubiert. Die Entfärbung erfolgte über Nacht in 10% Essigsäure.

### **2.8.7 Transfer, Immobilisierung und Nachweis von Proteinen (Western Blot)**

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern wurde die Methode von Towbin *et al.* (1979) angewandt. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden sie mit Hilfe eines Western Blots auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Porengröße 0,45 µm, Millipore, Bedford, USA) übertragen. Dazu musste die Membran wenige Minuten in 100% Methanol inkubiert, in Transferpuffer (10 mM CAPS, 10% Methanol, pH 11,0 NaOH) äquilibriert und dann in eine Blotapparatur (Amersham Biosciences, Freiburg) auf einen Stapel aus fünf in Transferpuffer getränkten Whatman 3 mm-Papieren (Schleicher und Schüll, Dassel) gelegt werden. Darauf wurde das Proteingel gelegt und mit einem weiteren Stapel aus fünf Whatman-Papieren bedeckt. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte durch angelegten Strom von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Oberfläche für 1 h. Die Kontrolle des Proteintransfers erfolgte durch eine dreiminütige reversible Proteinfärbung der Membran mit Ponceau-Rot (0,2% in 2%iger Essigsäure). Daraufhin wurde die Membran zunächst für 1 h in Blockierungslösung (5% Magermilchpulver oder 3% BSA in Western Blot Waschpuffer (50 mM Tris, 0,9% NaCl, pH 7,5 HCl) inkubiert. Dann wurde der erste Antikörper (Anti-His 1:1000 oder Anti-Strep 1:5000 (Qiagen, Hilden)) hinzugegeben und für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Western Blot Waschpuffer für je 20 min, wurde die Blockierungslösung mit dem entsprechenden zweiten Antikörper (Anti-Maus 1:10000 (Sigma)) auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C oder für 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde auf die Membran ein NBT/BCIP-Gemisch

(Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in Inkubationspuffer (10 mM Tris, HCl pH 8,8) gegeben und im Dunkeln bis zur gewünschten Signalstärke inkubiert.

### **2.8.8 Blue-Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Blue-Native-PAGE)**

Zur näheren Bestimmung eines Membranproteinkomplexes wurde dieser unter nativen Bedingungen (Schägger *et al.*, 1991) in einem Blue-Native-Gel (NativePAGE™ 4-16% Bis-Tris-Gel (1,0 mm x 10 wells)) aufgetrennt. Dazu wurden 60 µg einer Membranpräparation mit 1,5% DDM (Stock: 5% in H<sub>2</sub>O) solubilisiert (30 min, 4°C) und durch Zentrifugation (13000 rpm, 10 min bei 4°C) nicht gelöste Proteine abgetrennt. 17,7 µl der solubilisierten Proteinen wurden dann mit 6,2 µl 4 x Nativen Probenpuffer und 1,1 µl G-250 Sample-Additive versetzt und auf dem Blue-Native-Gel aufgetrennt. Als Marker dienten 5 µl des Native Mark™ Protein-Standards. Dem Blue-Native-Gel wurde für 30 min eine Spannung von 150 V in Anwesenheit von dunkelblauen Kathoden-Puffer (10 ml NativePAGE™ Running-Buffer, 10 ml NativePAGE™ Cathode-Additive, 180 ml H<sub>2</sub>O) angelegt. Woraufhin 1,5 h mit hellblauer Kathoden-Puffer (10 ml NativePAGE™ Running-Buffer, 1 ml NativePAGE™ Cathode-Additive, 189 ml H<sub>2</sub>O) bei gleicher Voltzahl folgten. Der Anoden-Puffer (30 ml NativePAGE™ Running-Buffer, 570 ml H<sub>2</sub>O) blieb unverändert. Der Western Blot entsprach dem der SDS-PAGE, wobei die PVDF-Membran nach dem Transfer für 15 min in 8% Essigsäure inkubiert wurde, um die Proteine zu fixieren. Anschließend wurde sie zur Entfernung restlicher Farbstoffe in Methanol und H<sub>2</sub>O gewaschen. Der Umrechnungsfaktor betrug 1,8 für das angelagerte Detergenz an den Proteinkomplex bei der späteren Proteingrößenbestimmung.

### **2.8.9 Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Native-PAGE)**

Im Gegensatz zur SDS-PAGE werden die Proteine in der nativen PAGE nicht denaturiert. Sie liegen während der elektrophoretischen Auftrennung gefaltet vor und werden somit nach Eigenladung, Größe und Form aufgetrennt. Die Trenngel-, Sammelgel- und Elektrodenpuffer wurden analog zur SDS-PAGE, jedoch ohne SDS hergestellt.

### **2.8.10 Katalase-Nachweis**

Der Nachweis von Katalase im Proteinlysate, das in einer Native-PAGE aufgetrennt worden war, wurde durch die Oxidation von Kaliumhexacyanoferrat (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>) durchgeführt, welches als rotes Blutlaugensalz ausfällt. Durch die Vernichtung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch

enzymatische Katalaseaktivität wird diese Reaktion verhindert. Das native Gel wurde mit H<sub>2</sub>O gespült, 10 min in einer Startlösung (0,003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) inkubiert und anschließend in einer Nachweislösung (1% FeCl<sub>3</sub>, 1% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>) bis zur ausreichenden Färbung inkubiert.

### **2.8.11 Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie**

Durch die Klonierung wurden die proteinkodierenden Gene mit zusätzlichen Sequenzen ausgestattet, die für einen Histidin- oder Strep-Tag codierten. Somit war nach der Expression der Gene die Reinigung des entsprechenden Proteins durch Affinitätschromatographie möglich. Die Aufreinigung Histidin-markierter Proteine erfolgte im *batch*-Verfahren mittels Ni-NTA-Agarose-Beats (Qiagen, Hilden) und unterschiedlich zusammengesetzten Puffern, in denen die Imidazolkonzentrationen nach Protokollen aus „The QIAexpressionist“, variierten. Die Aufreinigungen fanden unter nativen oder denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff) statt.

### **2.8.12 Identifizierung von Proteinen**

Die Proteinbanden aufgereinigter Proteine wurden aus den SDS-Gelen ausgestochen und mit Hilfe von *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) in der Zentralen Bioanalytik (ZBA) des Zentrums für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) analysiert und deren Aminosäureabfolge bestimmt.

### **2.8.13 Analytische Gelfiltration mittels Ausschlusschromatographie**

Die analytische Gelfiltration wurde zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von Proteinen verwendet, da in der Ausschlusschromatographie Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Bei globulären Proteinen besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der molaren Masse und dem Elutionsvolumen. Als Säulenmaterial wurde Superdex 200 in einem Säulenformat von 10/300 GL verwendet und ÄKTA Purifier Plattform (GE Healthcare, Upsalla; S) betrieben. Die Säule wurde mit dem entsprechenden Puffer äquilibriert und mittels des Gelfiltration-Kalibrierungskits HMW (GE Healthcare, Upsalla, S) geeicht. Jeweils 1 ml des zu analysierenden Proteins wurde zuvor über eine 5 ml äquilibrierte Entsalzungssäule „HiTrap Desalting“ (GE Healthcare, Upsalla, S) mit einer Flussrate von 0,75 ml/min vom Imidazol befreit und in einen entsprechenden Puffer umgepuffert. 500 µl des entsalzten Proteins (5 µg/µl) wurden mit Hilfe eines 500 µl *loops* aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem Säulenvolumen mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min, wobei die Proteinkonzentration bei 280 nm verfolgt wurde.

#### **2.8.14 Heterologe Expression von *cglK* und *cglK*-Varianten**

Kompetente *E. coli*-Zellen des Stammes BL21 wurden mit Expressionsplasmid pET-52b, das *cglk* oder *cglK\_M137I*-Gen codierte, transformiert. Für die Expressionskultur wurde über Nacht eine Vorkultur mit 1/10 des Volumens der Hauptkultur in LB-Medium inokuliert und bei 37°C, 125 rpm kultiviert. Die Hauptkultur wurde morgens auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 eingestellt und nach *circa* 3 h bei einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,8-1 mit 1 mM IPTG induziert. Nach 5 h bei 37°C, 125 rpm wurde die Kultur geerntet (JLA 10.500, 4500 rpm, 15 min, 4°C).

#### **2.8.15 Solubilisierung und Aufreinigung von CglK**

Das Zellpellet wurde im gleichen Volumen wie das Pellet in BAK (150 mM KCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, zwei Tabletten *complete* ohne EDTA (Roche) pro 200 ml BAK, 5 µg/ml DNase) resuspendiert und in vier Durchgängen in der *french press* (high modus 1200 psi) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (JA 25.50, 15000 rpm, 2 x 45 min, 4°C) entfernt. Der Überstand wurde in der Ultrazentrifuge (Ti 70, 55000 rpm, 4°C, 60 min) zentrifugiert, und das Membranpellet in BBK (150 mM KCl, 100 mM NaP, pH 7,0) resuspendiert. Die Solubilisierung der Membranproteine erfolgte mit 40 mM Decylmaltosid (DM) bei 4°C, 50 rpm über Nacht. Morgens wurden die nicht solubilisierten Membranproteine durch Ultrazentrifugation (75000 rpm, 45 min, 4°C) abgetrennt, der Überstand mit 15 mM Imidazol versetzt und der pH-Wert auf 7,8 eingestellt. Daraufhin wurde über das *batch*-Verfahren mit Ni-NTA beads (Qiagen) das His-markierte Protein aufgereinigt, wobei NiNTA-Äquilibrierungspuffer (BBK, 4 mM DM, 15 mM Imidazol, pH 7,8 NaOH), Waschpuffer (BBK, 4 mM DM, 30 mM Imidazol, pH 7,8 NaOH) und Elutionspuffer (BBK, 4 mM DM, 250-1000 mM Imidazol, pH 7,8 NaOH) verwendet wurden.

#### **2.8.16 Rekonstitution von CglK (Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg, ZmnH Hamburg)**

Die Entfernung von Imidazol in den Proteinelutionen der Aufreinigung erfolgte mittels PD-10 Säulen (NEB, USA). Die Säule wurde dazu mit 30 ml Detergenzpuffer äquilibriert. Daraufhin wurden 2,5 ml des aufgereinigten Proteins auf die Säule gegeben und mit 3,5 ml des Detergenzpuffers (50 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7,4, 50 mM NaCl, 4 mM DM) eluiert. Das zu verwendende Asolectin wurde in Chloroform und Methanol in einem Verhältnis von 2:1 gelöst und 1-2 h (RT) unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Über Nacht wurde das Asolectin dann zur Entfernung des Methanols und des Chloroforms lyophilisiert. Die lyophilisierte

Probe wurde dann in Detergenzpuffer gelöst und 15 min im Ultraschallbad inkubiert. Das gereinigte Protein wurde dann in einem Verhältnis von 1:100 (1:200) für 2 h bei RT schüttelnd inkubiert. Zur Entfernung von DM wurden 2 ml Calbiosorb auf eine Säule gegeben, und diese mit 30 ml Detergenzpuffer ohne DM äquilibriert. Das Protein-Lipid-Gemisch wurde mit dem Calbiosorb versetzt und 2 h schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe mit dem Calbiosorb wurde dann auf die Säule gegeben und mit 2-3 ml Detergenzpuffer ohne DM eluiert. Die gesammelte Probe wurde dann ultrazentrifugiert (RP-100 AT-4, 66000, 4°C, 1 h) und das resultierende Pellet in einem Puffer (200 mM NaCl, 10 mM MOPS, pH 7,4) resuspendiert. Daraufhin wurde erneut unter den gleichen Bedingungen ultrazentrifugiert. Das Pellet wurde dann in Dehydrationspuffer (150 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 10 µl CaCl<sub>2</sub>, 5 mM Hepes, pH 7,2) über Nacht inkubiert und gelöst.

### **2.8.17 *In vivo*-Lokalisierung des GFP-CgIK-Proteins in *C. glutamicum***

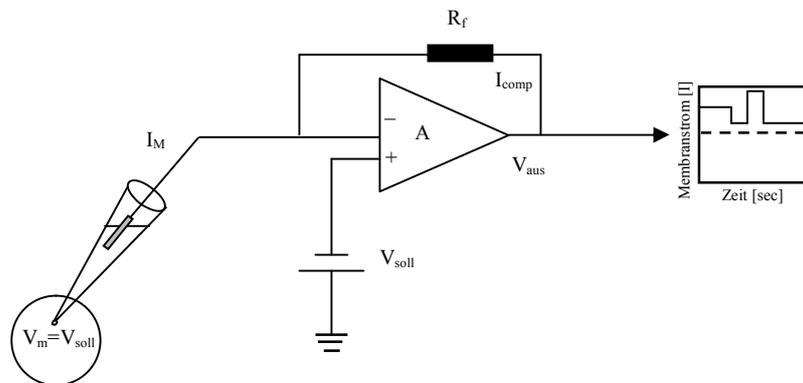
Für die *in vivo*-Lokalisierung von CgIK in *C. glutamicum* wurde zunächst ein pEKEx2-Plasmid kloniert, welches ein N-terminal markiertes GFP-CgIK-Fusionsproteine codierte. Die Expression erfolgte in  $\Delta cglK\Delta kup$ -Zellen durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG während der Kultivierung in Minimalmedium mit 5 mM KCl. Das GFP-CgIK-Proteins wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie lokalisiert. Dazu wurde ein Zeiss AxioImager M1 verwendet, der mit einer Zeiss AxioCam HRm-Kamera versehen war. Die GFP-Fluoreszenz wurde mit dem Filterset 38HE, GFP gemessen.

## **2.9 Elektrophysiologische Messungen**

### **2.9.1 Die *Patch-Clamp*-Technik**

Die *Patch-Clamp*-Technik stellt ein Messverfahren zur Untersuchung von Ionenströmen an Zellmembranen dar. Dabei wird die Membranspannung mit Hilfe einer Spannungsklemme auf einem konstanten Wert gehalten, um die dabei auftretenden Ströme zu messen. Am (+)-Eingang des Operationsverstärker OPA (A) wird eine Spannung angelegt ( $V_{\text{soll}}$ ), die am (-)-Eingang und somit auch an der Membran in der Messelektrode über eine Rückkopplungsschaltung auf demselben Potential gehalten wird. Wenn ein Membranstrom ( $I_M$ ) von der Messelektrode registriert wird, produziert der Operationsverstärker an seinem Ausgang eine Spannung ( $V_{\text{aus}}$ ), die über einen hohen Rückkopplungswiderstand ( $R_f$ ) einen Kompensationsstrom ( $I_{\text{comp}}$ ) mit entgegengesetzter Polarität schickt ( $I_{\text{comp}} = -I_M$ ). Somit ändert

sich die Membranspannung nicht, und am Oszilloskop am Ausgang des Operationsverstärkers wird ein Membranstrom gemessen, der proportional zu Spannung ( $V_{\text{aus}}$ ) ist ( $V_{\text{aus}} = R_f \cdot I_{\text{comp}}$ ).



**Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Patch-Clamp-Stromkreises (Spannungsklemme).** Dargestellt ist ein der Operationsverstärker (A), der Rückkopplungswiderstand ( $R_f$ ), der aufgenommene Strom ( $I_p$ ), die Sollspannung ( $V_{\text{soll}}$ ), der Kompensationsstrom ( $I_{\text{comp}}$ ) und die gemessene Spannung ( $V_{\text{aus}}$ ) (verändert nach Aidley, 1996).

### 2.9.2 Patch-Clamp-Messungen von Proteoliposomen (ZmnH Hamburg)

Die *Patch-Clamp*-Messungen wurden bei RT in Petrischalen ( $\varnothing$  35 mm), in denen auf Glasplättchen das dehydrierte Protein-Lipid-Gemisch vorlag, durchgeführt. Die eingesetzten Pipetten wurden aus dünnwandigem Borosilicatglas ( $\varnothing$  außen: 1 mm;  $\varnothing$  innen: 0,86 mm) mit Filament hergestellt (Vitrex GB150T-8P, Science Products GmbH). Dabei wurden sie in zwei Schritten mittels eines horizontalen Pipettenziehgerätes (DMZ-Puller, Zeitz Instrumente) gezogen, und mit einem glühenden Platin-Iridiumdraht unter einem Mikroskop mit einem Mikromanipulator an den Spitzen rund poliert. Die Pipettenwiderstände lagen zwischen 2 und 3,5 M $\Omega$ , was einer Öffnung von 1  $\mu\text{m}$  entsprach. Vor dem Messvorgang wurde jede Pipette mit Sigmacote (Sigma) beschichtet und mit der angegebenen Pipettenlösung befüllt. Über einen chlorierten Silberdraht war die Pipettenlösung mit dem Vorverstärker elektrisch verbunden. Zur Kontrolle der Annäherung der Pipette an die Proteoliposomen diente ein Axiovert-Mikroskop (Zeiss) mit 400facher Vergrößerung. Zur elektrischen Abschirmung war der gesamte Messtand von einem Faraday-Käfig umgeben. Durch Vibrationen auftretende Schwingungen wurden durch den Einsatz eines pneumatischen Schwingungstisches minimiert. Mittels eines hydraulischen Mikromanipulators konnte die Pipette präzise auf das zu vermessende Proteoliposom positioniert werden. Beim Eintauchen der Pipette in das Bad wurde leichter Überdruck angelegt. Durch einen 5 ms langen Testpuls von 5 mV wurde der elektrische Widerstand zwischen Bad- und Pipettenelektrode kontinuierlich bestimmt. Durch

Aufheben des Überdrucks und behutsames Saugen wurde die Ausbildung einer sehr engen mechanischen Verbindung zwischen dem Proteoliposom und der Pipette erreicht, die einen sehr hohen elektrischen Widerstand von mindestens 1 Giga-Ohm (*Seal*) besaß. Aus dieser *cell-attached*-Konfiguration konnte die Messkonfiguration des *inside-out patches* hergestellt werden. Durch eine axiale Bewegung mit dem Mikromanipulator wurde die Patchpipette ausgehend von der *cell-attached*-Konfiguration von der Zelle abgezogen, so dass die Innenseite des Membranpatches nach außen zeigte. Die von dem Vorverstärker gemessenen Stromsignale wurden als Spannung ausgelesen und an den Hauptverstärker weitergeleitet, welcher das Signal verstärkte und filterte (Filterfrequenz >1 kHz). Das Programm Pulse (HEKA Elektronik) erlaubte über einen Digital-Analog/Analog-Digital (DA-/AD)-Wandler eine Kommunikation mit dem Verstärker, wobei in einer Oszilloskopdarstellung des Programmes die gemessenen Stromkurven visualisiert werden konnten. Als Referenzelektrode diente ein im Bad befindliches Silber/Silberchlorid-Pellet, welches mit dem Vorverstärker verbunden war. Während der Messungen wurde die Badlösung über Zu- und Abläufe kontinuierlich ausgetauscht.

### 2.9.3 Isolierte *Patch-Clamp*-Messungen von *E. coli*-Sphäroplasten (IMS Aberdeen)

#### 2.9.3.1 Sphäroplasten-Präparation

Eine Übernachtskultur (LK-Medium, 400 rpm, 37°C) wurde 1/100 in 10 ml vorgewärmten LK-Medium kultiviert bis eine OD<sub>600</sub> zwischen 0,2-0,3 erreicht wurde. Dann wurden 3 ml der Zellen in 27 ml vorgewärmtes LK-Medium überführt und 60 µg x ml<sup>-1</sup> Cephalixin hinzugefügt. Daraufhin wurde für weitere 2,5 h kultiviert, wobei in der letzten Stunde 1 mM IPTG hinzugefügt wurden bis die Zellen geerntet wurden (1600 rpm, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 2,5 ml 0,8 M Saccharose bei RT resuspendiert. Die Plastingreaktion erfolgte nach folgendem Schema:

#### Plastingreaktion

Zugabe (0 min)	125 µl 1 M Tris HCl (pH 8,0)
	120 µl 5 mg x ml <sup>-1</sup> Lysozym
	30 µl 5 mg x ml <sup>-1</sup> DNAase
	150 µl 125 mM NaEDTA

Nach 6 min wurden 1 ml Stopplösung hinzugefügt und dann 2 ml der Plastingreaktion in 7,5 ml Verdünnungslösung pipettiert. Daraufhin wurden die Sphäroplasten durch maximal drei Zentrifugationen bei 1800 rpm, 4°C, 5 min geerntet. Der Überstand wurde dann abgesaugt, so dass 100-200 µl übrig blieben, in denen die Sphäroplasten resuspendiert und als 50 µl Aliquots bei -20°C gelagert wurden.

Stöcke:

1 M Tris HCl pH 8,0 (Tris BASE Ultrapure)

5 mg x ml<sup>-1</sup> Lysozym (-20°C)

5 mg x ml<sup>-1</sup> DNAase (-20°C)

125 mM NaEDTA pH 7,8 (1 M NaOH)

Stopplösung (1 ml)

0,8 M Saccharose 875 µl

H<sub>2</sub>O 125 µl

MgCl<sub>2</sub> 20 µl

Tris-HCl 10 µl

Verdünnungslösung (15 ml)

0,8 M Saccharose 15 ml

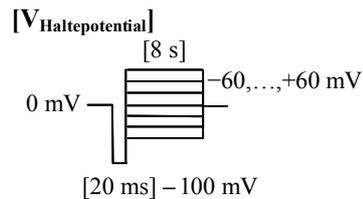
MgCl<sub>2</sub> 150 µl

Tris-HCl 150 µl

#### **2.9.4 Patch-Clamp Messungen von *E. coli*-Sphäroplasten**

Einzelkanal-Messungen wurden an *excised, inside-out patches* aus präparierten *Giant E. coli*-Sphäroplasten (Martinac *et al.*, 1987) durchgeführt. Dazu wurden 5-7 µl der Sphäroplasten in ein Bad mit 30-150 mM KCl, 0-150 mM NaCl, 90 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub> und 5 mM HEPES Puffer (pH 7,4) überführt. Borosilicate Glaspipetten (100 µl) (Drummond Scientific Co., Broomall, USA) wurden mittels eines Flammung/Brown Pipetten-Pullers (Model P-97, Sutter Instrument Co., Novato, USA) dünnggezogen, so dass der Durchmesser einen Pipettenwiderstand zwischen 3-6 MΩ aufwies. Diese Pipetten wurden mit der gleichen Lösung wie das Bad befüllt. Die Applikation von negativem Druck durch Ansaugen der Pipette wurde mittels einer Spritze vollzogen und über einen Druck-Monitor (PM015R, Word Precision Instruments, USA) in mm Hg gemessen. Alle Aufnahmen wurden nach der

Standard *Patch-Clamp*-Prozedur (Hamill *et al.*, 1981) bei RT durchgeführt. Stromspuren wurden bei konstanten Haltepotentialen mit einem Vorpuls von  $-100$  mV für 20 ms zwischen  $-60$  und  $60$  mV für 8 s aufgenommen (Abb. 2.2).



**Abb. 2.2:** Schematische Darstellung der applizierten Spannungsprotokolle.

Die Ionenströme, die durch die Aktivierung der Kanalproteine hervorgerufen wurden, sind bei  $50$  kHz mit einem  $5$  kHz Filter des AxoPatch 200 Verstärkers (Axon Instruments Inc. California, USA) erfasst und die Kanalaktivitäten mit Hilfe der pCLAMP10 Software (Axon Instruments, USA) analysiert worden. Alle Messungen wurden an mindestens sechs *patches* von mindestens zwei separaten Sphäroplasten-Präparationen durchgeführt.

### 2.9.5 Bestimmung der Einzelkanalleitfähigkeit von CgIK

Die Stromdichte durch einen Kanal kann als das Produkt dreier Faktoren betrachtet werden, der Einzelkanalleitfähigkeit  $\gamma$ , der Offenwahrscheinlichkeit  $P_o$  sowie der Anzahl der Kanäle  $n$  in der Plasmamembran (Gleichung 13).

$$I = \gamma * P_o * n \quad (\text{Gleichung 13})$$

Da Einzelkanalmessungen die Beobachtungen stromleitender Öffnungen einzelner Ionenkanäle erlauben, konnten über die *inside-out Patch-Clamp*-Konfiguration der Parameter der Einzelkanalleitfähigkeit erfasst werden, wobei die erhaltenen *patches* bei verschiedenen Potentialen charakterisiert wurden. Die Einzelkanalleitfähigkeit  $G_{SC}$  berechnet sich aus der oberen Grenze der erreichten Stromstärke  $I_{\text{max}}$  und der unteren erreichten Stromstärke  $I_{\text{min}}$  bei der entsprechenden angelegten Spannung  $U$  (Gleichung 14).

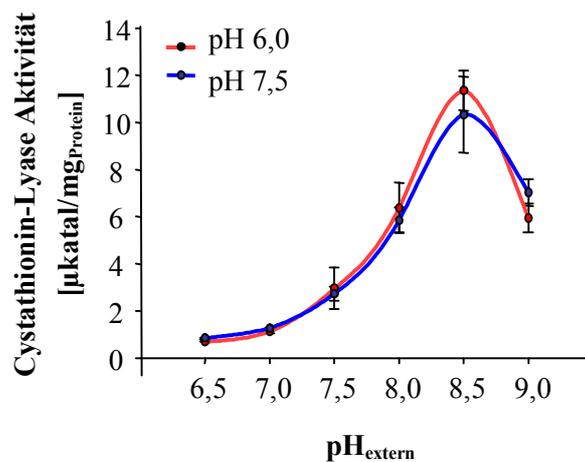
$$(I_{\text{max}}(\text{pA}) - I_{\text{min}}(\text{pA})) * 1000 / U(\text{mV}) = G_{SC}(\text{pS}) \quad (\text{Gleichung 14})$$

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Auswirkungen von pH-Stress auf den Stoffwechsel von *C. glutamicum* und Bedeutung der Kaliumaufnahme

##### 3.1.1 Die externe Zugabe von Cystein verstärkt die pH-Sensitivität im sauren Bereich

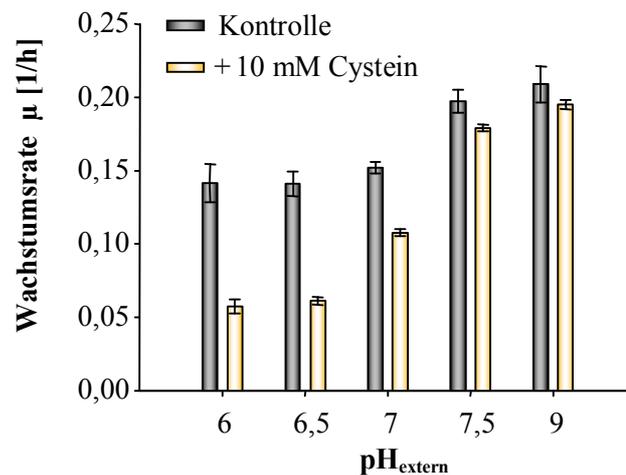
Aus den Transkriptom- und Proteomanalysen der bei pH 6,0 kultivierten *C. glutamicum*-Zellen ist hervorgegangen, dass Gene, die für Proteine des Methionin- und Cysteinsyntheseweges codieren, im Vergleich zu bei pH 7,5 kultivierten Zellen, induziert sind (Follmann *et al.*, 2009b). Von der Induktion ausgenommen ist *aecD*, welches die Cystathionin- $\beta$ -Lyase AecD codiert, die die Reaktion von Cystathionin zu Homocystein katalysiert. Der unveränderte mRNA-Gehalt von *aecD* spiegelte sich auch auf Proteomebene wider, wobei sich die Cystathionin-Lyase-Aktivität im Proteinlysate von Zellen, die bei pH 7,5 und pH 6 kultiviert worden waren, in Testansätzen mit unterschiedlichen pH-Werten nicht unterschied (Abb. 3.1). Das pH-Optimum der AecD-Aktivität lag bei 8,5 und die Aktivität war bei pH 6,5 stark verringert.



**Abb. 3.1: Cystathionin-Lyase-Aktivität.** Dargestellt ist die Aktivität der Cystathionin-Lyase AecD aus dem Gesamtproteinlysate von Zellen, die bei pH 6,0 (rot), bzw. pH 7,5 (blau) in Minimalmedium kultiviert wurden, bei unterschiedlichen pH-Werten im Testansatz (n=3).

Metabolomanalysen haben ergeben, dass eine Akkumulation der Intermediate, die im Stoffwechsel vor AecD liegen, stattfindet (Follmann *et al.*, 2009b). Dabei sind die Metabolite, die im Stoffwechsel hinter AecD liegen, vermindert. Die externe Zugabe der vermindert vorliegenden Intermediate Cystathionin, Homocystein und Methionin hatten auf das Wachstum bei pH 6,0 im Vergleich zu pH 7,0 keinen positiven Einfluss (Daten nicht gezeigt).

Wurden hingegen 10 mM Cystein zugesetzt, so war eine pH-abhängige Wachstumsinhibition erkennbar. Während die Zugabe von Cystein bei den pH-Werten 9,0 und 7,5 keinen Effekt auf die Wachstumsraten zeigte, war bei pH 7,0 das Wachstum verlangsamt und bei pH 6,5 und 6,0 waren die Zellen nahezu wachstumsunfähig (Abb. 3.2). Hohe Cysteinkonzentrationen haben somit in Abhängigkeit vom pH-Wert einen toxischen Effekt auf das Wachstum der *C. glutamicum*-Zellen. Damit scheint nicht ein Mangel an Methionin, sondern eine Akkumulation von Cystein zu einer pH-abhängigen Wachstumsinhibition zu führen.

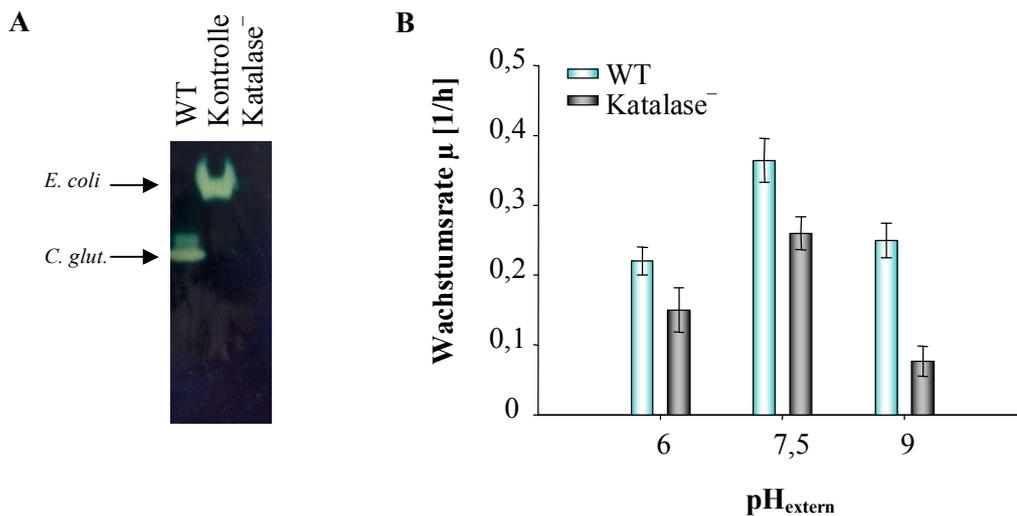


**Abb. 3.2: Einfluss von Cystein auf das Wachstum von *C. glutamicum*.** Dargestellt sind die Wachstumsraten mit Minimalmedium ohne Cystein-Zugabe (grau) oder mit zusätzlich 10 mM Cystein (gelb) bei unterschiedlichen pH-Werten. Die Experimente wurden in Mikrotiterplatten (MTP) durchgeführt (n=8).

### 3.1.2 Bei neutralem und tiefem pH wird endogen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produziert

In Transkriptom- und Proteomanalysen von Zellen, die bei alkalischem pH kultiviert worden waren, war das Gen der Katalase als induziert, bzw. die Katalase als vermehrt vorliegend im Vergleich zu Zellen, die unter alkalischen Bedingungen kultiviert worden waren, identifiziert worden (Follmann *et al.*, 2009b). Eine *Katalase*-Insertionsmutante (*Katalase*<sup>-</sup>), deren fehlende Katalaseaktivität bestätigt wurde (Abb. 3.3A), zeigte bei neutralem und saurem pH nur mäßig verringerte Wachstumsraten, wohingegen unter alkalischen Bedingungen nahezu kein Wachstum detektierbar war (Abb. 3.3B). Desweiteren wurde der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehalt in Fermenter-Kulturen des Wildtyps (WT) bei unterschiedlichen pH-Werten bestimmt. Während der exponentiellen Phase wurden wesentlich höhere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen bei pH 6,5 als bei pH 7,5 und pH 9,0 gemessen (Daten nicht gezeigt). In Kulturen mit gepuffertem Medium war die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration bei pH 6,0 mit 20 μM ebenfalls wesentlich höher als mit ungefähr 3 μM bei pH 7,5 und pH 9,0. Wachstumsexperimente mit WT-Zellen in Schüttelkolben

zeigten, dass bei externer Zugabe von 16 KU/ml aufgereinigter Katalase aus *E. coli* sich die Wachstumsrate bei pH 7,5 von ungefähr  $0,34 \text{ h}^{-1}$  auf  $0,39 \text{ h}^{-1}$ , und bei pH 9,0 von  $0,28 \text{ h}^{-1}$  auf  $0,30 \text{ h}^{-1}$  steigerte, während sie bei pH 6,0 mit ungefähr  $0,22 \text{ h}^{-1}$  unverändert blieb. Somit stellt die Katalaseaktivität der *C. glutamicum*-Zellen bei tiefen pH-Werten nicht die alleinige Limitation für das Wachstum dar.

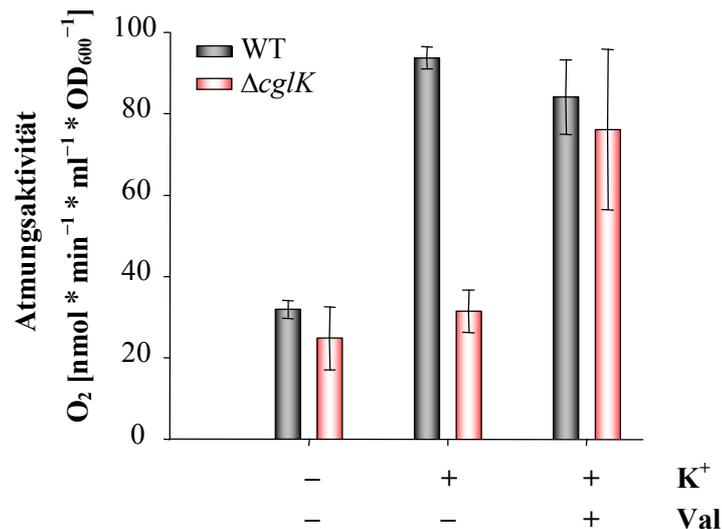


**Abb. 3.3: Nachweis der Katalaseaktivität und Wachstumsraten bei unterschiedlichen pH-Werten von *C. glutamicum*-Zellen des WT und der Katalase-Insertionsmutante (Katalase<sup>-</sup>).** Der enzymatische Katalasenachweis erfolgte in einem nativen Proteingel, in dem jeweils 30 µg Proteingesamtextrakt aufgetrennt wurden. Als Kontrolle wurden 100 µg aufgereinigte Katalase aus *E. coli* (Boeringer) aufgetragen. Die Pfeile weisen auf die Stellen, in denen die Aktivität einer Katalase sichtbar ist (A). Die Zellen der Stämme WT und Katalase<sup>-</sup> wurden in Minimalmedium mit unterschiedlichen pH-Werten in Schüttelkolben kultiviert, und die Wachstumsraten bestimmt (B) (n=3).

### 3.1.3 Kaliumaufnahme beeinflusst die Atmungsaktivität bei tiefem pH

Neben den metabolischen Veränderungen und dem oxidativen Stress, wurde auch eine essentielle Funktion von Kalium in der pH-Stressantwort identifiziert. Unter neutralen pH-Bedingungen lag die Atmungsaktivität von *C. glutamicum*-Zellen des WT in der Anwesenheit von Kalium bei rund 90 und ohne Kalium bei ungefähr  $65 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} * \text{ml}^{-1} * \text{OD}_{600}^{-1}$ . Die Zellen der *cglK*-Deletionsmutante ( $\Delta cglK$ ) verbrauchten kaliumunabhängig rund  $45 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} * \text{ml}^{-1} * \text{OD}_{600}^{-1}$ . Messungen des Sauerstoffverbrauches nach einem externen pH-Shift von 7,5 auf 6,0 von WT- und  $\Delta cglK$ -Zellen zeigten, dass in Abwesenheit von Kalium in beiden Kulturen die Atmungsaktivität auf rund  $30 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} * \text{ml}^{-1} * \text{OD}_{600}^{-1}$  reduziert war (Abb. 3.4). Die darauffolgende externe Zugabe von 50 mM Kalium verdreifachte den Sauerstoffverbrauch in der WT-Kultur auf  $94 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} * \text{ml}^{-1} * \text{OD}_{600}^{-1}$ , während er in der  $\Delta cglK$ -Kultur nahezu unverändert blieb.

Erst die Zugabe des kaliumselektiven Ionophores Valinomycin führte ebenfalls in der  $\Delta cglK$ -Kultur zu einem Anstieg der Atmungsaktivität auf  $83 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} * \text{ml}^{-1} * \text{OD}_{600}^{-1}$  in der Anwesenheit von Kalium. Vergleichbare Messwerte sind auch in einer  $\Delta cglK$ - $\Delta kup$ -Kultur bestimmt worden (Daten nicht gezeigt).



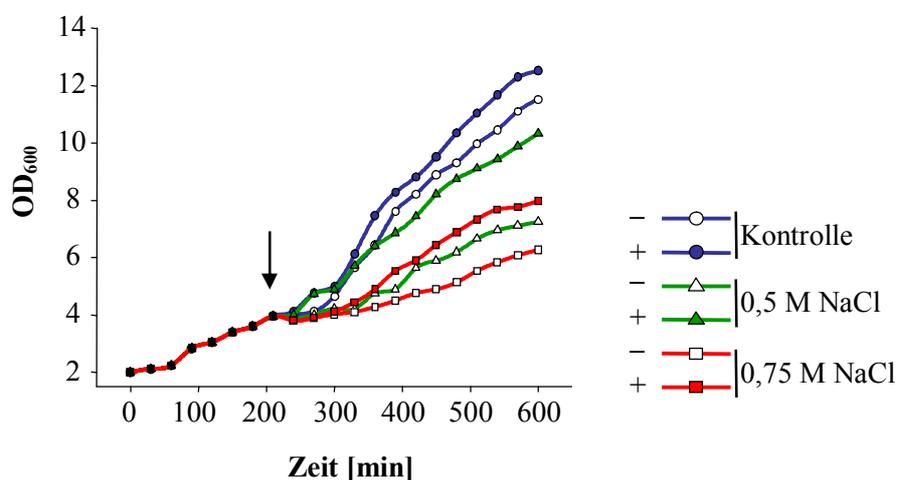
**Abb. 3.4: Einfluss von Kalium auf die Atmungsaktivität bei tiefem pH.** Kaliumentleerte Zellen des WT und der  $\Delta cglK$ -Mutante wurden einem pH-Shift von 7,5 auf 6,0 ausgesetzt, woraufhin 50 mM KCl (K<sup>+</sup>) mit oder ohne 20  $\mu$ M Valinomycin (Val) hinzugefügt wurden. Die Atmungsaktivität der Zellen wurde direkt nach dem pH-Shift über die Rate des Sauerstoffverbrauchs ermittelt (n=3).

Die Aktivität der Atmungskette wird somit in der Abwesenheit von Kalium bei tiefem externen pH-Wert in den *C. glutamicum*-Zellen stark verringert. Mit dem Kaliumstrom durch CgIK geht eine Steigerung der Atmungsaktivität der Zellen einher. In Zellen, die kein Kalium aufnehmen können wird erst durch die Zugabe des kaliumselektiven Ionophors die Membran kaliumdurchlässig, so dass die Atmungsaktivität im vergleichbaren Maße, wie in den WT-Zellen erhöht wird. Folglich ist nicht das CgIK-Protein an sich, sondern der dadurch vermittelte Kaliumstrom für den stimulierenden Effekt auf die Atmungskette verantwortlich. Die Anwesenheit von Kalium ist jedoch nicht nur bei pH-Stress, sondern auch unter anderen Stressbedingungen für die Zelle von essentieller Bedeutung.

## 3.2 Bedeutung von Kalium unter hyperosmotischen Bedingungen

### 3.2.1 Kaliumabhängiges Wachstum von *C. glutamicum* unter hyperosmotischen Bedingungen

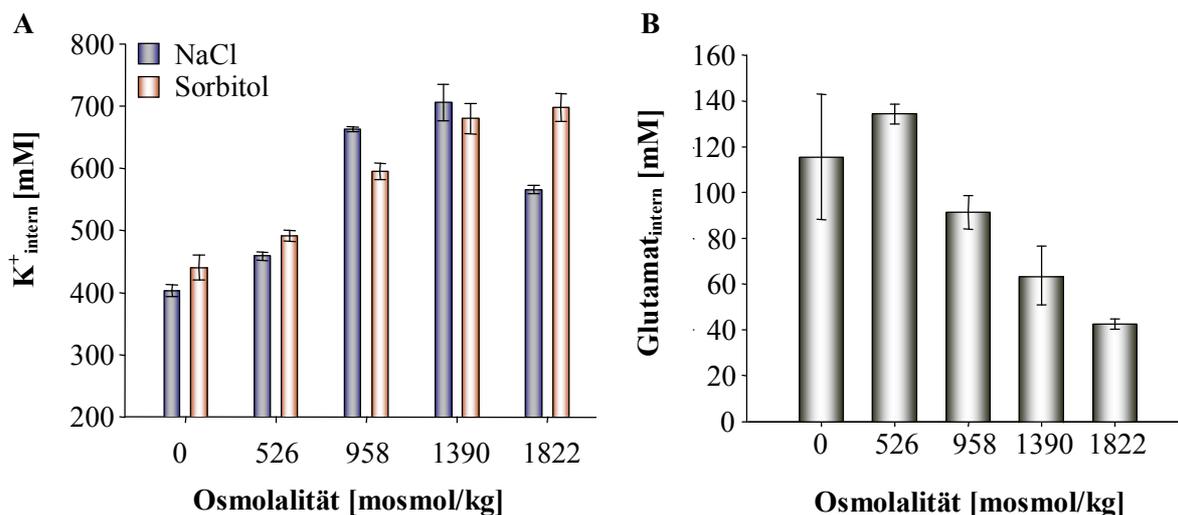
Die Kaliumbedürftigkeit von *C. glutamicum* wurde in Wachstumsexperimenten mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen im Minimalmedium untersucht. Kaliumgehungerte WT-Zellen wurden bis in die frühe exponentielle Phase kultiviert, und dann in einzelne Kulturen mit zusätzlich 0,5 M, 0,75 M oder keinem NaCl in der An- oder Abwesenheit von 10 mM KCl aufgeteilt (Abb. 3.5). War Kalium vorhanden, so waren die Wachstumsraten in der Anwesenheit von Salzstress höher als ohne Kaliumzusatz. Unabhängig von der Kaliumanwesenheit betrug die Wachstumsrate ohne zusätzliche NaCl-Zugabe ungefähr  $0,2 \text{ h}^{-1}$ . In der Anwesenheit von 0,5 M NaCl lagen die Wachstumsraten unabhängig von der Kaliumkonzentration bei einem Wert von ungefähr  $0,17 \text{ h}^{-1}$ . Bei Salzstress durch die Zugabe von 0,75 M NaCl war das Wachstum der Zellen ohne Kalium stark verlangsamt, ihre Wachstumsrate betrug  $0,09 \text{ h}^{-1}$ , während in der Anwesenheit von Kalium die Zellen mit einer Rate von  $0,17 \text{ h}^{-1}$  wuchsen. Nach der Zugabe von 1 M NaCl war kaliumunabhängig kein Wachstum mehr detektierbar (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls unter osmotischen Stressbedingungen in der Anwesenheit unterschiedlicher Sorbitolkonzentrationen, einer nicht-ionischen Substanz, war Kalium für das Wachstum der Zellen notwendig (Daten nicht gezeigt). Somit ist Kalium für das Wachstum von *C. glutamicum* unter hyperosmotischen Bedingungen notwendig.



**Abb. 3.5: Einfluss von Kalium auf das Wachstum von *C. glutamicum* unter hyperosmotischen Bedingungen.** Kaliumentleerte Zellen des WT wurden in Minimalmedium ohne Kalium bis zur frühen exponentiellen Phase kultiviert, und dann hyperosmotischem Stress durch die Zugabe von 0,5 oder 0,75 M NaCl in der (+) An- oder (-) Abwesenheit von 10 mM Kalium ausgesetzt. Die  $OD_{600}$  wurde dokumentiert und der Pfeil weist auf den Zeitpunkt der Stressapplikation.

### 3.2.2 Die Akkumulation von Kalium bei osmotischem Stress geht nicht mit einer Glutamatakkumulation einher

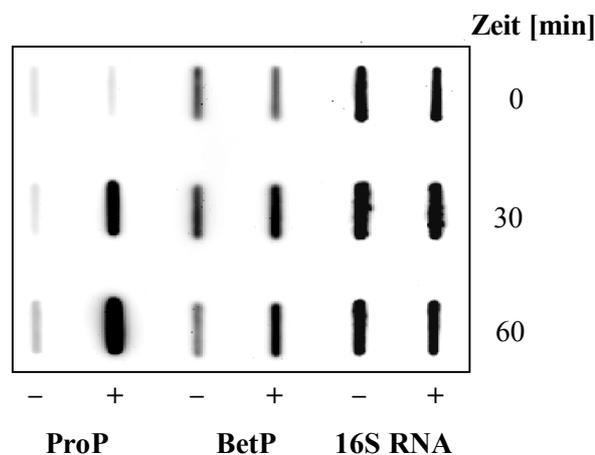
Interne Kaliumkonzentrationen von WT-Zellen, die unter verschieden starken hyperosmotischen Bedingungen in der Anwesenheit von 1 mM KCl kultiviert worden waren, wurden flammenphotometrisch bestimmt. Der höchste interne Kaliumgehalt wurde in den Zellen nach achtstündiger Inkubation in der Anwesenheit von 0,75 M NaCl (1390 mosmol/kg) mit rund 700 mM gemessen (Abb. 3.6A). In der Anwesenheit von 1 M NaCl (1822 mosmol/kg) war die interne Kaliumakkumulation niedriger als mit 0,75 M NaCl. Die Applikation von Sorbitol-Konzentrationen, die in ihrer osmotischen Wirksamkeit denen der NaCl-Konzentrationen entsprachen, hatten bis zu einer Osmolalität von 1390 mosmol/kg den gleichen Einfluss auf die interne Kaliumakkumulation der Zellen wie NaCl. Die interne Glutamatkonzentration der Zellen war bei 0,75 M NaCl im Minimalmedium mit ungefähr 70 mM jedoch zehnmal geringer als der interne Kaliumgehalt (Abb. 3.6B), und erreichte unter Kontrollbedingungen (300 mosmol/kg), bzw. in der Anwesenheit von 0,25 M NaCl (526 mosmol/kg) den höchsten Wert. Somit liegt eine positive Korrelation zwischen dem internen Kaliumgehalt der Zellen und der externen Osmolytkonzentration, unabhängig ob es sich um ionische oder nicht-ionische Substanzen handelt, bis zu einer bestimmten Stressintensität vor. Für den internen Glutamatgehalt der Zellen besteht hingegen eine negative Korrelation zur Stressintensität und internen Kaliumkonzentration.



**Abb. 3.6:** Einfluss von ionischem und nicht-ionischem Stress auf den internen Kalium- und Glutamatgehalt von *C. glutamicum*. Von WT-Zellen wurde nach achtstündiger Kultivierung in Minimalmedium mit pH 8,5 in der Anwesenheit von 1 mM KCl und zusätzlichen 0, 526, 958, 1390 oder 1822 mosmol/kg NaCl oder Sorbitol der interne Kaliumgehalt flammenphotometrisch bestimmt (A). Ebenfalls wurde der interne Glutamatgehalt der Zellen mittels HPLC-Analyse ermittelt (B) (n=3).

### 3.2.3 Kaliumabhängige Induktion der Expression von *betP* und *proP* nach Erhöhung der externen Salzkonzentration

Um die Funktion der Kaliumakkumulation in *C. glutamicum* bezüglich der Genexpression bei Salzstress zu charakterisieren, wurden die Gene *betP* und *proP* ausgewählt. Diese Gene zählen zu denen, die am stärksten bei Salzstress in *C. glutamicum* induziert werden (Fränzel *et al.*, 2009) und codieren Transporter für kompatible Solute. Durch BetP und ProP werden Betain und Prolin von der Zelle aufgenommen. Nach Erhöhung der externen Salzkonzentration in An- oder Abwesenheit von Kalium wurden RNA-Hybridisierungsexperimente mit Hilfe spezifischer Sonden für beide Gene durchgeführt. Dazu sind *C. glutamicum*-Zellen des WTs kaliumgehungert, bis zur mittleren exponentiellen Phase kultiviert, und dann einem osmotischem Schock durch eine Erhöhung der externen Osmolalität von 300 mosmol/kg auf 1390 mosmol/kg durch die Zugabe von 0,75 M NaCl mit oder ohne 10 mM KCl, ausgesetzt worden. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Northern Blot Analysen mit den RNA-Extrakten der Zellen durchgeführt (Abb. 3.7).



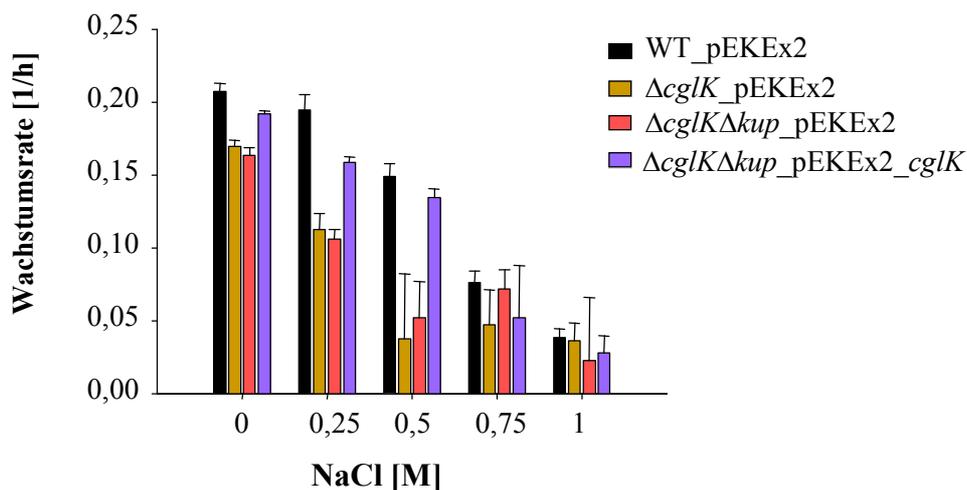
**Abb. 3.7: Auswirkungen eines osmotischen Schocks in An- und Abwesenheit von Kalium auf den mRNA-Gehalt von *proP* und *betP*.** Durch die Zugabe von 0,75 M NaCl zu kaliumentleerten *C. glutamicum* WT-Zellen in der An- (+) oder Abwesenheit (-) von 10 mM KCl wurde die Osmolalität des Minimalmediums von 300 auf 1390 mosmol/kg erhöht. Die RNA der Zellen für den Northern Blot wurde jeweils vor dem Osmoschock (0 min), bzw. 30 sowie 60 min danach isoliert. Zur Kontrolle der Gesamt-RNA-Konzentrationen wurde der 16S RNA-Gehalt jeweils parallel detektiert.

Eine *proP*-Expression war unter Kontrollbedingungen nicht detektierbar, jedoch 30 min nach dem osmotischen Schock nur in der Anwesenheit von Kalium stark induziert. Auch nach 60 min war dieser Anstieg der Expression ausschließlich in der Kultur mit 10 mM KCl zu erkennen, während ohne Kalium nur eine schwache Bande der *proP*-mRNA detektiert wurde. Eine Expression von *betP* war schon unter Kontrollbedingungen deutlich sichtbar und wurde

nur in der Anwesenheit von Kalium 30 und 60 min nach der Salzzugabe ebenfalls erhöht. Ohne Kalium war erst 60 min nach dem osmotischen Schock der mRNA-Gehalt von *betP* deutlich reduziert. Somit ist unmittelbar nach einem osmotischen Schock Kalium für die Induktion der Expression der Gene *betP* und *proP* im Rahmen der Stressantwort der Zelle essentiell.

### 3.2.4 CgIK ist unter hyperosmotischen Bedingungen essentiell

Bei niedrigen externen pH-Werten ist CgIK in *C. glutamicum* als das Hauptaufnahmesystem für Kalium identifiziert worden (Follmann *et al.*, 2009a). Um zu untersuchen, ob CgIK ebenfalls unter hyperosmotischen Bedingungen für die Kaliumaufnahme verantwortlich ist, wurden Wachstumsexperimente mit Zellen der Stämme WT\_pEKEEx2,  $\Delta cglK$ \_pEKEEx2,  $\Delta cglK\Delta kup$ \_pEKEEx2 und  $\Delta cglK\Delta kup$ \_pEKEEx2\_ *cglK* in Minimalmedium mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen in der Anwesenheit von 10 mM Kalium durchgeführt (Abb. 3.8). Ohne zusätzliche Salzzugabe wuchsen die Zellen von  $\Delta cglK$ \_pEKEEx2 und  $\Delta cglK\Delta kup$ \_pEKEEx2 nur geringfügig schlechter als der Stamm WT\_pEKEEx2. In der Anwesenheit von 0,25 M NaCl waren hingegen die Wachstumsraten der Stämme  $\Delta cglK$ \_pEKEEx2 und  $\Delta cglK\Delta kup$ \_pEKEEx2 nur halb so groß wie die des WT. Nur die  $\Delta cglK\Delta kup$ -Zellen mit dem Expressionsplasmid pEKEEx2\_ *cglK* konnten annähernd so gut wie der WT wachsen.



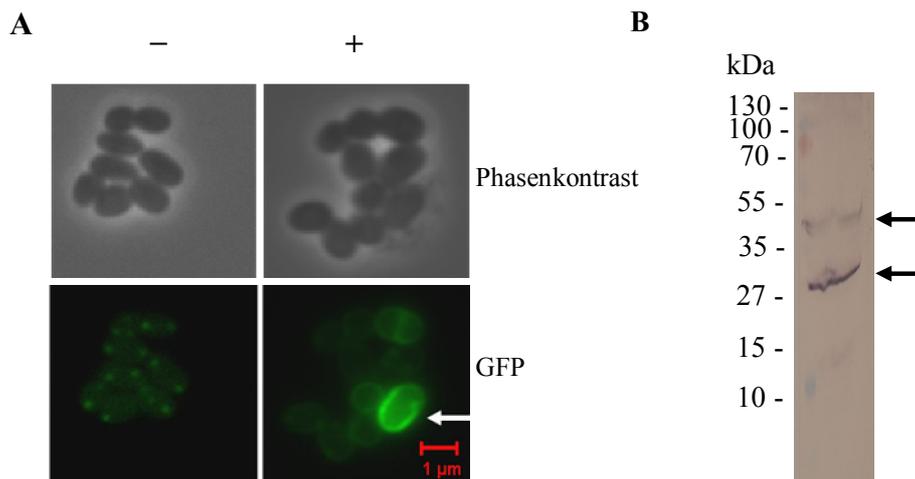
**Abb. 3.8:** Wachstum der *C. glutamicum* Stämme WT\_pEKEEx2,  $\Delta cglK$ \_pEKEEx2,  $\Delta cglK\Delta kup$ \_pEKEEx2 und  $\Delta cglK\Delta kup$ \_pEKEEx2\_ *cglK* bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen. Die kaliumentleerten Zellen wurden in Minimalmedium (pH 7,5) mit 10 mM KCl in MTP mit zusätzlich 0; 0,25; 0,5; 0,75 oder 1 M NaCl kultiviert. Das Wachstum wurde über sechs Stunden dokumentiert, und in der exponentiellen Phase die Wachstumsrate bestimmt (n=8).

In der Anwesenheit von 0,5 M NaCl wuchsen ausschließlich Zellen mit genomischer oder plasmidcodierter *cgIK*-Sequenz. Bei höheren NaCl-Konzentrationen von 0,75 und 1 M war das Wachstum aller Stämme gleichermaßen eingeschränkt. Somit sind *C. glutamicum*-Zellen ohne *cgIK* salzsensitiv. Unter diesen hyperosmotischen Bedingungen ist CgIK das Hauptaufnahmesystem für Kalium, während Kup keine Funktion hat.

### 3.3 Untersuchungen zum Aufbau von CgIK aus *C. glutamicum*

#### 3.3.1 Funktionelle Expression von *cgIK* in *C. glutamicum*

Sowohl bei pH-Stress, als auch bei Osmostress war die Kaliumaufnahme durch CgIK notwendig. Zur weiteren Untersuchung der Funktion von CgIK und zur *in vivo* Lokalisierung der CgIK-Proteine (*C. glutamicum* Kaliumkanal) in *C. glutamicum* wurde ein pEKEx2\_Plasmid kloniert, das die Sequenz für ein N-terminal markiertes GFP-CgIK-Fusionsprotein codierte, um ausschließlich Signale von Proteinen mit Transmembrandomänen (TM) zu erhalten. Die Expression wurde in  $\Delta cgIK\Delta kup$ -Zellen, die in Minimalmedium mit 10 mM KCl kultiviert wurden, durch die Zugabe von 1 mM IPTG über acht Stunden induziert, und führte zur Komplementation des kaliumabhängigen pH-sensitiven Wachstumsphänotyps (Daten nicht gezeigt).

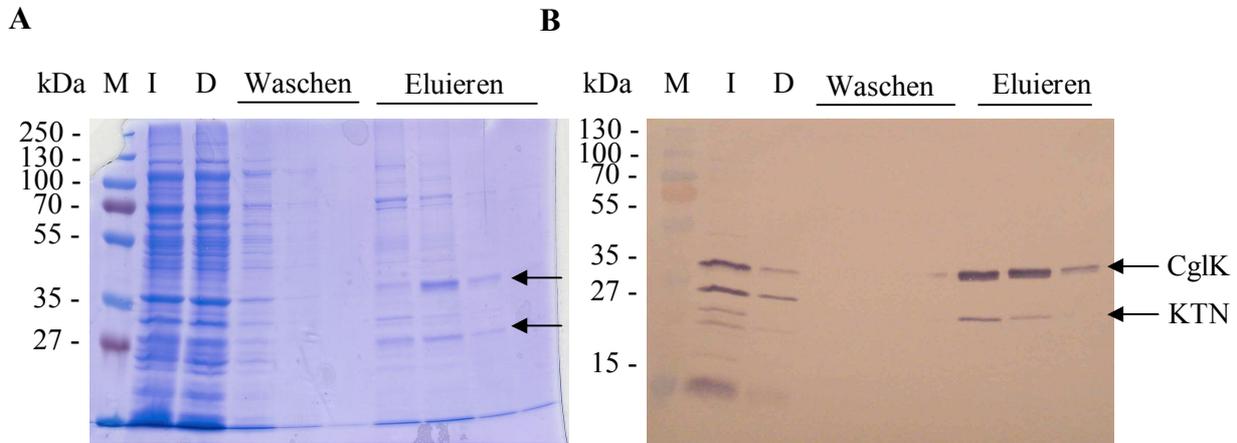


**Abb. 3.9: *In vivo* Lokalisation des N-terminal markierten GFP-CgIK-Proteins und Western Blot des C-terminal markierten CgIK-Strep-Proteins in *C. glutamicum*.** Dargestellt sind die Phasenkontrastbilder und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (GFP) von *C. glutamicum*-Zellen des Stammes  $\Delta cgIK\Delta kup$  mit dem Plasmid pEKEx2\_GFP\_*cgIK*, die über acht Stunden in Minimalmedium mit 10 mM KCl nicht induziert (-) oder mit 1 mM IPTG (+) kultiviert wurden. Die GFP-Fluoreszenz (grün) wurde mit einem entsprechenden Filtersystem gemessen, wobei der weiße Pfeil auf eine Zelle mit GFP-CgIK-Proteinen weist (A). Western Blot mit Anti-Strep-Antikörpern von 50 μg Membranproteinfraction der  $\Delta cgIK\Delta kup$ \_pEKEx2\_*cgIK*-Zellen, die mit 0,5 mM IPTG in Minimalmedium mit 10 mM KCl über Nacht kultiviert wurden (B). Die Signale auf der Höhe von 27 kDa und 36 kDa sind durch schwarze Pfeile markiert.

Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops wurde die GFP-Fluoreszenz gemessen, wobei GFP-CgIK-Proteine eindeutig in der Membran von *C. glutamicum* lokalisiert waren (Abb. 3.9A). Desweiteren wurde die Expression von einem pEKEx2-Plasmid verifiziert, welches ein C-terminal Strep-markiertes CgIK-Protein codierte. Die Expression wurde in  $\Delta cglK\Delta kup$ -Zellen, die in Minimalmedium in Anwesenheit von 10 mM KCl kultiviert wurden, durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG über vierzehn Stunden induziert. Auch hier komplementierte die Expression von *cglK* den kaliumabhängigen Wachstumsphänotyp der Deletionsmutante (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden 50  $\mu$ g der Membranfraktion in einem Western Blot analysiert. Dabei wurden Strep-markierte CgIK-Proteine in der Membranfraktion nachgewiesen (Abb. 3.9B). Aufgrund der C-terminalen Markierung konnte neben dem CgIK-Strep-Protein auf einer Höhe von 36 kDa, was der theoretisch erwarteten Größe entsprach, auch ein zusätzliches Protein auf einer Höhe von 27 kDa nachgewiesen werden. Somit kann *cglK* homolog in *C. glutamicum* funktionell exprimiert werden, wobei zusätzlich noch ein weiteres Protein von der mRNA translatiert wird.

### **3.3.2 Die mRNA von *cglK* wird auch in *E. coli* in ein CgIK- und ein separates KTN-Protein translatiert**

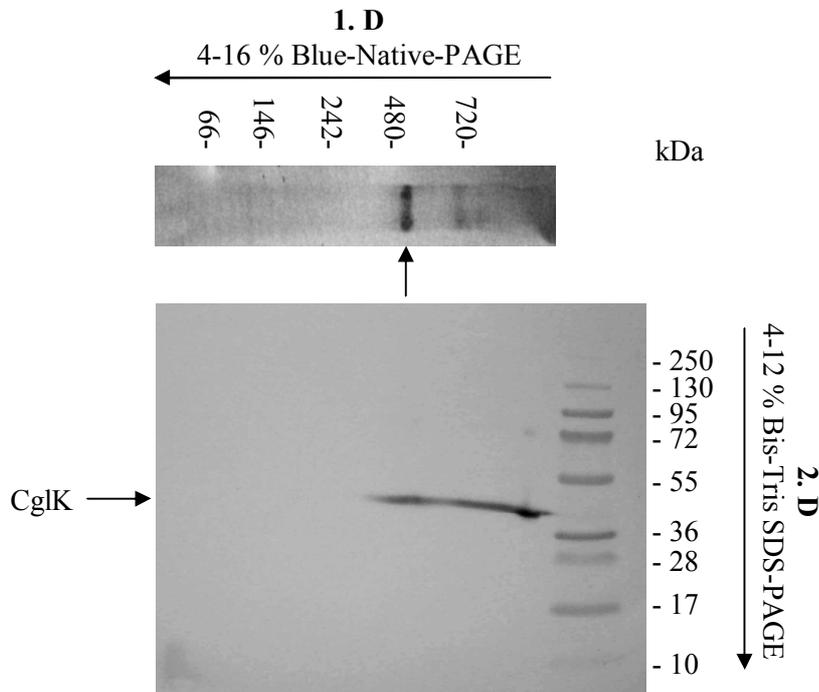
Um CgIK für weitere biochemische Untersuchungen in ausreichenden Mengen aufzureinigen zu können, wurde *cglK* heterolog in *E. coli* überexprimiert. Dazu wurde *cglK* in den Vektor pET52b mit einer C-terminalen His-Markierung kloniert und im *E. coli*-Stamm BL21 exprimiert (Abb. 3.10A). Der Aufschluss und die Aufreinigung über Affinitätschromatographie mit Ni-NTA erfolgten unter denaturierenden Bedingungen im *batch*-Verfahren. Zwei Proteinbanden, der Größe 36 und 27 kDa waren in der anschließenden SDS-PAGE (Abb. 3.10A) und im Western Blot detektierbar (Abb. 3.10B). Die Analyse der Aminosäuresequenz der beiden Proteine mit Hilfe der von *Peptide Mass Fingerprint* zeigte, dass die Peptidabfolge des 27 kDa großen Proteins nur den Bereich der löslichen KTN-Domäne, und das 36 kDa große Protein das gesamte CgIK-Protein inklusive den Transmembrandomänen abdeckten (Anhang Abschnitt. 6.1). Die mRNA von *cglK* wird somit auch in *E. coli* neben einem CgIK-Vollängenprotein, zusätzlich von dem internen Startcodon aus, in ein separates lösliches KTN-Potein translatiert.



**Abb. 3.10: Aufreinigung der Proteine CglK und KTN mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie.** Das *cglK*-Gen wurde in den Vektor pET52b mit einer C-terminalen Penta-His-Markierung in *E. coli*-Zellen des Stammes BL21 exprimiert und mit 40 mM DM solubilisiert. Während der Aufreinigung im *batch*-Verfahren wurden Proben des Inputs (I) (15 mM Imidazol), des Durchflusses (D), der drei Waschungen (30 mM Imidazol) und drei Elutionen (250, 500, 750 mM Imidazol) fraktioniert. Jeweils 15  $\mu$ l der Fraktionen wurden in einer 10%, bzw. 15% SDS-PAGE aufgetrennt und einer Coomassie-Färbung (A), bzw. einer Western Blot Analyse mit einem Anti-His-Antikörper (B) unterzogen. Mit schwarzen Pfeilen sind auf der Höhe von 36 kDa und 27 kDa die Signale des CglK- bzw. des KTN-Proteins, die mittels PMF identifiziert wurden (Anhang Abb. 6.1), markiert.

### 3.3.3 Solubilisiertes CglK-Protein bildet membranintegrierte Oligomere

Um den vorhergesagten CglK-Komplex zu charakterisieren, und die mögliche Coassemblierung der KTN-Proteine nach der Solubilisierung zu untersuchen, wurden 60  $\mu$ g Protein der Membranfraktion aus dem Expressionsansatz von *cglK* in *E. coli* mit 1,5% Dodecylmaltosid (DDM) solubilisiert. Davon wurden 24  $\mu$ g unter nativen Bedingungen in einer Blue-Native-PAGE aufgetrennt und anschließend ein Western Blot durchgeführt (Abb. 3.11). Es zeigte sich, dass die CglK-Proteine definierte ungefähr 500 kDa große Komplexe bildeten. Die Auftrennung dieses Komplexes aus der Blue-Native-PAGE in einer zweiten Dimension in einer SDS-PAGE zeigte, dass sich der solubilierte Komplex ausschließlich aus 37 kDa großen CglK-Volllängenproteinen ohne zusätzlich assemblierte KTN-Proteine zusammensetzte. Der CglK-Komplex im Blue-Native-Gel besteht somit nach der Korrektur mit dem Faktor 1,8 für die molekulare Masse des an die solubilierten Proteine angelagerten DDMs (Heuberger *et al.*, 2002) aus einem CglK-Protein-Oktamer (8 x 37 kDa), während die KTN-Proteine im Aufarbeitungsprozess verloren gegangen sind. Welche Bedeutung die separaten KTN-Proteine, bzw. die KTN-Domänen bei der Funktionalität von CglK haben, wurde in den folgenden Ansätzen physiologisch untersucht.



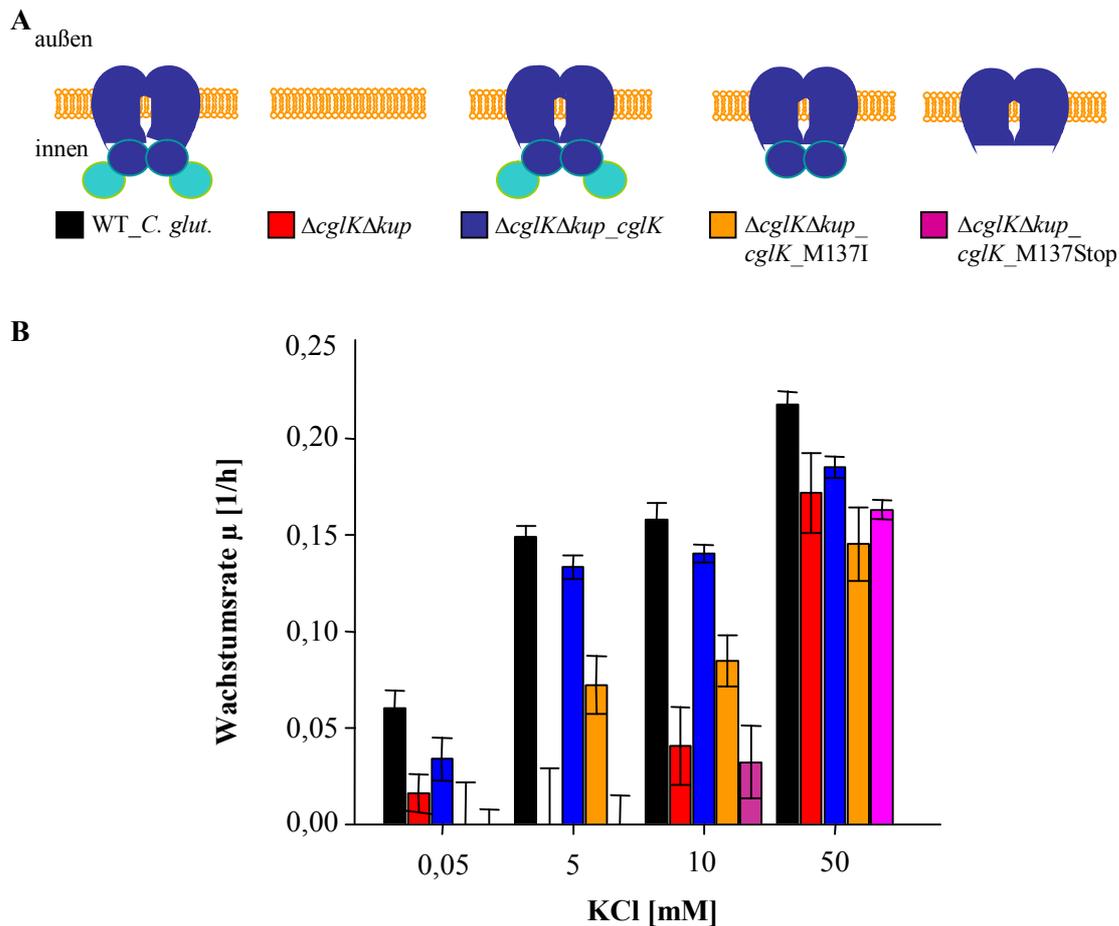
**Abb. 3.11:** Western Blots der solubilisierten Membranfraktion eines *cglK*-Expressionsansatzes, die in der ersten Dimension (1. D) in einer Blue-Native-PAGE und anschließend in der zweiten Dimension in einer SDS-PAGE (2. D) aufgetrennt wurde. 60  $\mu\text{g}$  der Membranproteinfraktion des Expressionsansatzes aus *E. coli* wurden mit 1,5% DDM solubilisiert und davon 24  $\mu\text{g}$  in einer 4-16%igen Blue-Native-PAGE unter nativen Bedingungen aufgetrennt. Daraufhin wurde ein Western Blot mit einem Anti-His-Antikörper durchgeführt. Mit dem vertikalen Pfeil ist der detektierte Proteinkomplex auf einer Höhe von 500 kDa markiert. Desweiteren wurden die in der Blue-Native-PAGE aufgetrennten Proteine in einer zweiten Dimension in einer 4-12%igen Bis-Tris SDS-PAGE aufgetrennt, und ebenfalls ein Western Blot mit einem Anti-His-Antikörper durchgeführt. Die Bande des CglK-Vollängenproteins ist mit einem horizontalen Pfeil auf der Höhe von 37 kDa markiert.

### 3.4 Die KTN-abhängige Funktion von CglK in *C. glutamicum* und *E. coli*

#### 3.4.1 Der Verlust der separaten KTN-Proteine schränkt das Wachstum von *C. glutamicum* bei tiefem pH-Wert ein

Um die Funktion der KTN-Module zu untersuchen, die sowohl in den C-terminalen KTN-Domänen von CglK, als auch als separate KTN-Proteine vorkommen, wurde der Einfluss unterschiedlicher plasmidcodierter Varianten des *cglK*-Gens auf den pH-sensitiven Wachstumsphänotyp der  $\Delta cglK\Delta kup$ -Mutante analysiert. Neben dem Gen *cglK* wurde ein Gen in den Expressionsvektor pEKEx2 kloniert, welches durch Mutation des internen Startcodons (M137I) in ein Codon für Isoleucin die separate Translation des löslichen KTN-Proteins verhindern sollte (*cglK\_M137I*). Eine andere *cglK*-Variante (*cglK\_M137Stop*)

codierte nur die Transmembrandomänen, bzw. den Membranteil von CglK, ohne die C-terminale KTN-Domänen (Abb. 3.12A).



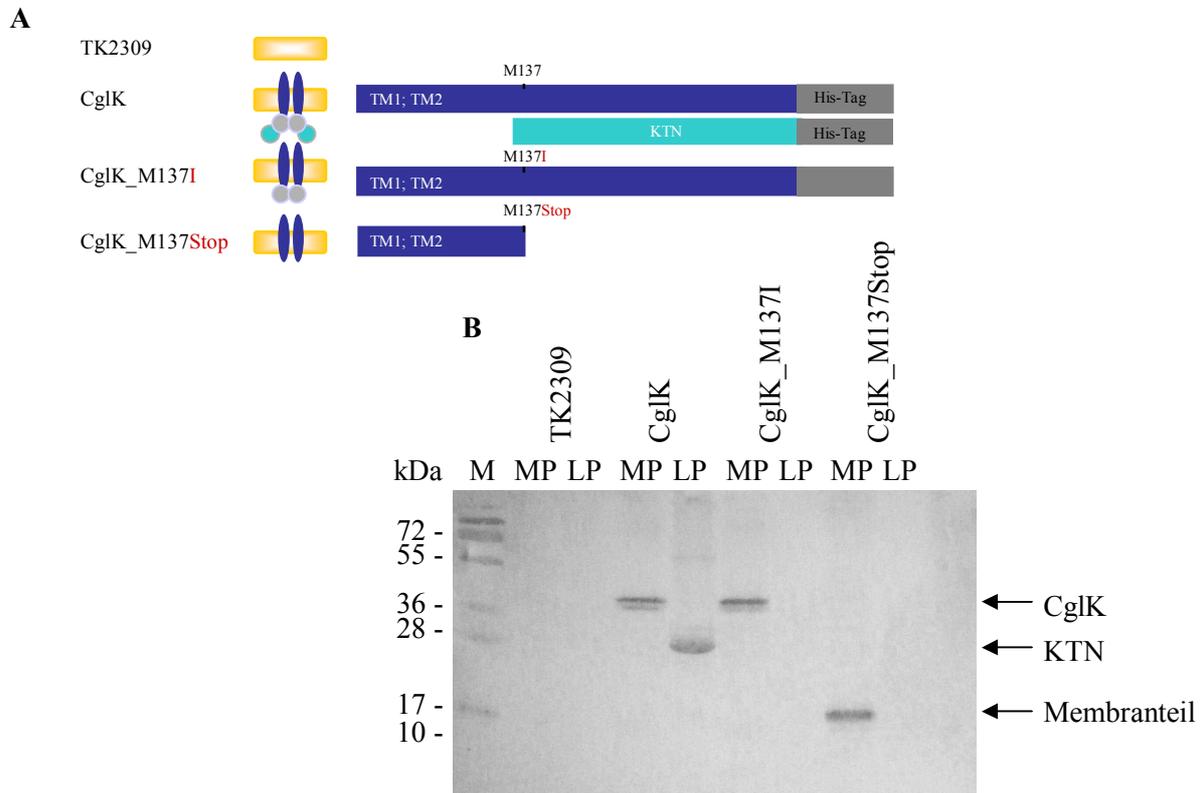
**Abb. 3.12: Einfluss verschiedener CglK-Varianten auf die pH-Sensitivität der *C. glutamicum*-Mutante  $\Delta cglK\Delta kup$  bei unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen.** Schematische Darstellung der CglK-Varianten. Die Transmembrandomänen von CglK sind in die Membran integriert (dunkel blau), die KTN-Domäne (grau) und die separaten löslichen KTN-Proteine (türkis) befinden sich im Cytoplasma. Die Stämme WT,  $\Delta cglK\Delta kup$ ,  $\Delta cglK\Delta kup\_pEKEx2\_cglK$ ,  $\Delta cglK\Delta kup\_pEKEx2\_cglK\_M137I$  und  $\Delta cglK\Delta kup\_pEKEx2\_cglK\_M137Stop$  wurden in Minimalmedium bei pH 6,5 mit Kaliumkonzentrationen von 0, 5, 10 und 50 mM und einer Start- $OD_{600}$  von 0,1 in MTP kultiviert. Das Wachstum wurde sechs Stunden lang dokumentiert und die Wachstumsrate  $\mu$  (1/h) bestimmt (n=8).

Die verschiedenen rekombinanten Stämme wurden in Minimalmedium bei pH 6,5 mit unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen kultiviert. In der Anwesenheit von 10 und 5 mM KCl wuchsen sowohl der WT, als auch die  $\Delta cglK\Delta kup$ -Mutante mit dem plasmidcodierten *cglK*-Gen nahezu gleich gut (Abb. 3.12B). Die  $\Delta cglK\Delta kup$ -Mutanten, die keine *cglK*-Sequenz oder nur *cglK\_M137Stop* enthielten, waren in Anwesenheit von 5 mM KCl oder geringeren Kaliumkonzentrationen nicht wachstumsfähig. Die Mutante  $\Delta cglK\Delta kup$  mit der plasmidcodierten Sequenz *cglK\_M137I* zeigte hingegen einen intermediären

Wachstumsphänotyp. Ihre Wachstumsraten waren niedriger als die des WTs, jedoch signifikant höher als die der  $\Delta cglK\Delta kup$ -Mutante mit pEKEx2. Dieser Unterschied war bei einer Kaliumkonzentration von 5 mM am deutlichsten, während die  $\Delta cglK\Delta kup$ -Mutante mit pEKEx2 nicht wuchs, war der Stamm  $\Delta cglK\Delta kup\_pEKEx2\_cglK\_M137I$  wachstumsfähig. Somit schränkt der Verlust der separaten KTN-Proteine die physiologische Funktion von CglK in *C. glutamicum* teilweise ein. Die ausschließliche Expression der Transmembrandomänen von CglK zeigte hingegen keinen Effekt, wobei die Expression aller *cglK*-Varianten im Western Blot nicht nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

### 3.4.2 Konstruktion und Expression von *cglK* und -Varianten im *E. coli* Stamm TK2309

Um das CglK-Protein und die CglK-Varianten physiologisch näher charakterisieren und gleichzeitig die Expression auf proteinbiochemischer Ebene qualifizieren zu können, wurde *cglK* aus *C. glutamicum* im *E. coli*-Stamm TK2309 ( $kdp^-$ ,  $trkA^-$ ,  $kup^-$ ), der über keine Kaliumaufnahme-systeme mehr verfügt, im Vektor pTrc\_*cglK* mit einem C-terminalen His-Tag exprimiert. Desweiteren wurde zum einem mittels ortsgerichteter Mutagenese der Vektor pTrc\_*cglK*\_M137I für eine CglK-Variante ohne separate KTN-Proteine erstellt, und zum anderen wurde nur die Sequenz kloniert, die die Transmembrandomänen von CglK codierte, so dass der Vektor pTrc\_*cglK*\_M137Stop entstand (Abb. 3.13A). Die Kontrolle der Expression der Konstrukte im *E. coli*-Stamm TK2309 erfolgte nach Membranpräparation, anschließender SDS-PAGE und Western Blot Analyse (Abb. 3.12B). In der Membranproteinfraktion von TK2309\_*cglK* (CglK) war ein Signal auf der Höhe von 37 kDa erkennbar, welches der Größe des CglK-Vollängenkonstruktes entspricht. In der löslichen Membranfraktion war bei 27 kDa ein Signal des löslichen KTN-Proteins zu erkennen. In der cytoplasmatischen Fraktion von TK2309\_*cglK*\_M137I (CglK\_M137I) wurde kein separates KTN Protein nachgewiesen, während in der Membranfraktion das Signal des CglK-Vollängenkonstruktes in gleicher Intensität wie bei TK2309\_*cglK* auftrat. Die Expression der *cglK*\_M137Stop-Variante zeigte in der Membranfraktion ein Signal in der Höhe von 14 kDa, während kein lösliches Protein nachgewiesen wurde. Dies entspricht der Größe des Membranteils von CglK. Somit konnten sowohl *cglK*, als auch die unterschiedliche CglK-Varianten im *E. coli* Stamm TK2309 in großen Mengen exprimiert werden, wobei das Vollängenprotein, sowie der Membranteil von CglK in die *E. coli*-Membran integriert wurden, und das lösliche KTN-Protein im Cytoplasma vorlag.

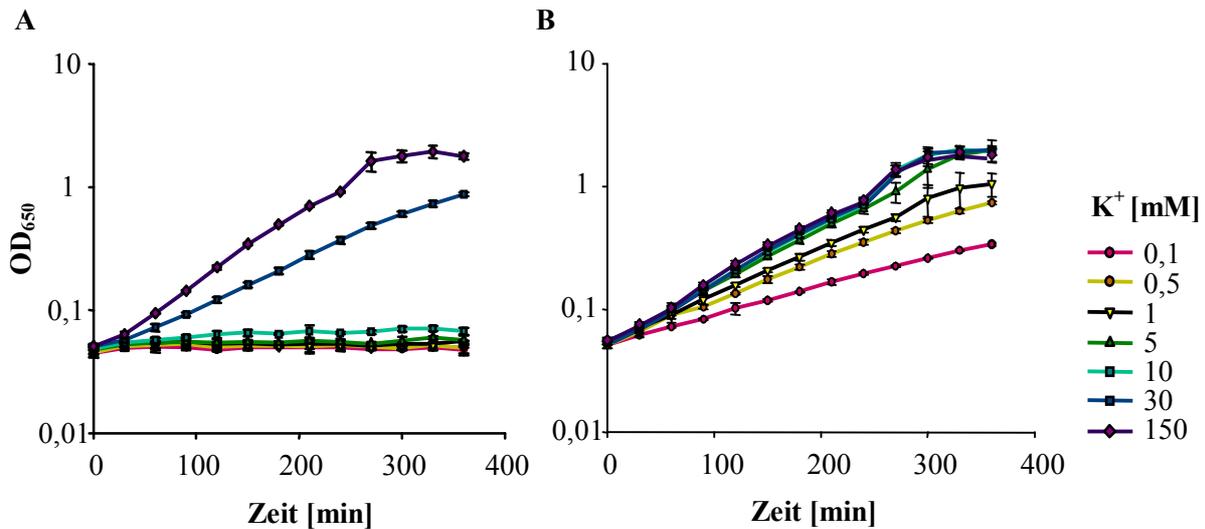


**Abb. 3.13: Konstruktion und heterologe Expression von *cglK* und *cglK*-Varianten im *E. coli*-Stamm TK2309.** Konstruktion der *cglK*-Varianten (A). Mittels ortgerichteter Mutagenese wurde das interne Startcodon M137 in ein Codon für Isoleucin umgewandelt (M137I), so dass keine separate Translation von KTN stattfinden konnte. Desweiteren wurde die Sequenz, die nur den Membranteil von CglK codierte (M137Stop), exprimiert. Western Blot mit Anti-His-Antikörpern der 14% SDS-PAGE mit aufgetrennten Membranproteinen (MP) und löslichen Proteinen (LP) (jeweils 15 µg) der Stämme TK2309, TK2309\_pTrc\_*cglK*, TK2309\_pTrc\_*cglK*\_M137I und TK2309\_pTrc\_*cglK*\_M137Stop; (M=Marker) (B).

### 3.4.3 Einfluss der heterologen Expression von *cglK* und *cglK*-Varianten auf das Wachstum von *E. coli* TK2309

Um die Funktionalität von CglK und den CglK-Varianten im *E. coli* Stamm TK2309 zu untersuchen, wurden Wachstumsexperimente ohne IPTG-Zusatz bei unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen durchgeführt. Die jeweiligen Zellen wurden in  $K_{30}$ -Medium vorkultiviert, mit  $K_0$ -Medium gewaschen und in  $K_x$ -Medien (x steht für die finale  $K^+$ -Konzentration in mM) mit den angegebenen Kaliumkonzentrationen kultiviert. Der *E. coli*-Stamm TK2309 benötigte mindestens 30 mM  $K^+$  für das Wachstum in Minimalmedium (Abb. 3.14A). Rekombinante TK2309-Zellen mit dem Plasmid pTrc\_*cglK* wuchsen schon in der Anwesenheit von 0,1 mM KCl, wobei sich das Wachstum mit ansteigenden Konzentrationen bis 30 mM verbesserte (Abb. 3.14B). In der Anwesenheit von 30 und 150 mM Kalium gab es keine Wachstumsunterschiede zwischen den Stämmen TK2309 und TK2309\_pTrc\_*cglK*.

Somit kann durch die heterologe Expression von *cglK* der kaliumsensitive Phänotyp des Stammes TK2309 schon bei geringen Kaliumkonzentrationen komplementiert werden, und bei hohen externen Kaliumkonzentrationen tritt keine Wachstumsinhibition auf.

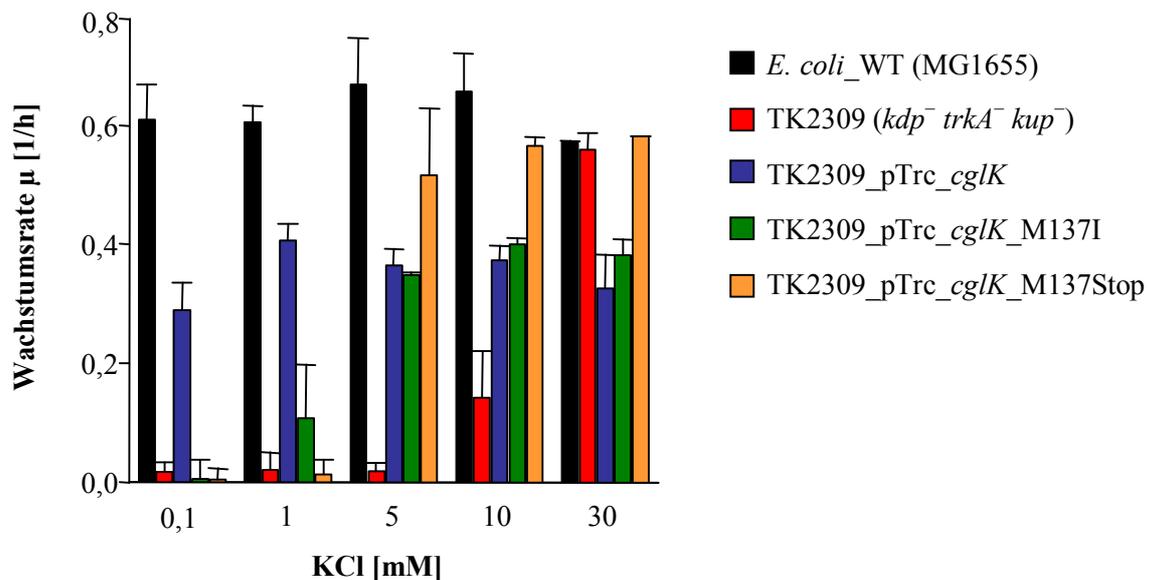


**Abb. 3.14: Wachstumskurven der *E. coli*-Stämme TK2309 und TK2309\_pTrc\_cglK.** In Schüttelkolben mit  $K_x$ -Medium mit Kaliumkonzentrationen zwischen 0,1 und 150 mM wurde die  $OD_{650}$  der Stämme TK2309 (A) und TK2309\_pTrc\_cglK (B) sechs Stunden lang dokumentiert (n=3).

Zur Untersuchung der physiologischen Auswirkungen der induzierten Expression von *cglK* und den *cglK*-Varianten, wurde neben den rekombinanten TK2309-Stämmen, der *E. coli*-WT MG1655 in Wachstumsexperimenten in unterschiedlichen  $K_x$ -Medien in der Anwesenheit von 1 mM IPTG kultiviert. In der Anwesenheit von 30 mM Kalium waren alle Stämme wachstumsfähig, jedoch zeigten die rekombinante Zellen mit CglK und der Variante CglK\_M137I um ein Drittel niedrigere Wachstumsraten als die Zellen der Stämme WT, TK2309 und TK2309\_pTrc\_cglK\_M137Stop. In der Anwesenheit von 5 mM Kalium wuchsen alle rekombinanten TK2309-Stämme, während TK2309 ohne Plasmid wachstumsunfähig war. Bei 1 mM Kalium wuchs TK2309 mit CglK um die Hälfte schlechter, als der WT, während TK2309\_CglK\_M137I sich durch sehr viel langsames Wachstum auszeichnete.

Somit hat die induzierte Expression im Vergleich zur nicht-induzierten Expression von *cglK* und *cglK\_M137* einen negativen Effekt auf das Wachstum von TK2309 bei hohen externen Kaliumkonzentrationen. Die Anwesenheit des Membranteils von CglK, CglK\_M137Stop, führt erst ab einer bestimmten externen Kaliumkonzentration zu einer nahezu vollständigen Komplementation des Wachstumsphänotyps von TK2309. Desweiteren ist die Komplementation des TK2309 Phänotyps durch CglK ohne separate KTN-Proteine,

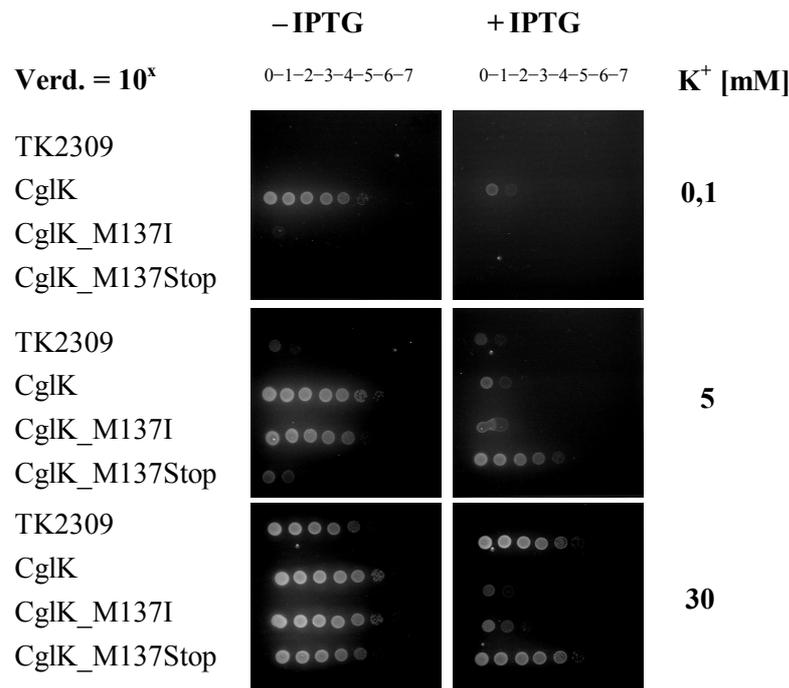
CglK\_M137I, bei niedrigen Kaliumkonzentrationen weniger effektiv als die durch das vollständige CglK.



**Abb. 3.15: Komplementation des kaliumabhängigen Wachstumsphänotyps vom *E. coli*-Stamm TK2039 durch die induzierte Expression von *cgIK* und den *cgIK*-Varianten.** Zellen des WT<sub>s</sub> (MG1655), TK2309, TK2309\_pTrc\_*cgIK*, TK2309\_pTrc\_*cgIK*\_M137I und TK2309\_pTrc\_*cgIK*\_M137Stop wurden in K<sub>30</sub>-Medium vorkultiviert, mit K<sub>0</sub>-Puffer gewaschen und in K<sub>x</sub>-Medium mit den angegebenen Kaliumkonzentrationen in der Anwesenheit von 1 mM IPTG kultiviert. Das Wachstum wurde über sechs Stunden bei OD<sub>600</sub> dokumentiert, und die Wachstumsraten in der exponentiellen Phase berechnet (n=3).

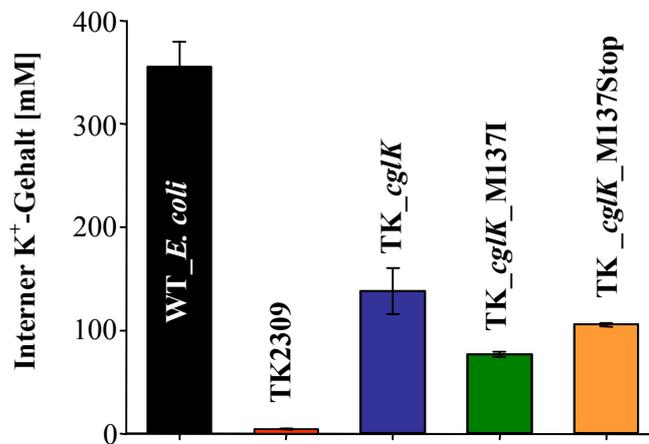
Um neben den Komplementationsversuchen in Flüssigkultur auch den Einfluss von IPTG bezüglich CglK und den CglK-Varianten auf das Wachstum von TK2309 über einen längeren Zeitraum und mehreren Generationen zu betrachten, wurden Tropfeste auf K<sub>x</sub>-Agarplatten (x steht für die finale K<sup>+</sup>-Konzentration in mM) mit und ohne IPTG durchgeführt. Dazu wurden die unterschiedlichen Zellen in K<sub>30</sub>-Medium vorkultiviert, in K<sub>0</sub>-Puffer gewaschen und in unterschiedlichen Verdünnungen auf K<sub>x</sub>-Agarplatten aufgetropft. Auf Agarplatten ohne IPTG-Zugabe konnte eine Komplementation durch CglK ab 0,1 mM KCl beobachtet werden (Abb. 3.16). Die *cgIK*\_M137I Expression komplementierte den TK2309-Wachstumsphänotyp erst in der Anwesenheit von 5 mM KCl, wenn sie nicht induziert war. Bei induzierter Expression von *cgIK* oder *cgIK*\_M137I wuchsen die rekombinanten TK2309-Stämme kaliumunabhängig nur sehr eingeschränkt. Sowohl die Zellen mit *cgIK*\_M137Stop, als auch der TK2309-Stamm wuchsen hingegen IPTG-unabhängig uneingeschränkt auf den K<sub>30</sub>-Platten, während bei induzierter Genexpression der Stamm TK2309\_*cgIK*\_M137Stop auch in der Anwesenheit von 5 mM KCl wachsen konnte.

Somit führt die starke Induktion der Expression von *cgkK* und *cgkK\_M137I* in längeren Zeiträumen zu einer Wachstumsinhibition, während der Membranteil von CgkK erst überexprimiert werden muss, um bei ausreichend hoher externer Kaliummenge einen positiven Effekt auf das Wachstum der *E. coli* TK2309-Zellen zu zeigen.



**Abb. 3.16:** Wachstum der *E. coli*-Stämme TK2309, TK2309\_pTrc\_*cgkK*, TK2309\_pTrc\_*cgkKM137I* und TK2309\_pTrc\_*cgkKM137Stop* auf K<sub>0</sub>-Medium Agarplatten ( $\pm$  1 mM IPTG) mit 0,1; 5 oder 30 mM KCl. Die in K<sub>30</sub>-Medium kultivierten und mit K<sub>0</sub>-Puffer gewaschenen Zellen wurden auf OD<sub>600</sub>=0,4 verdünnt, um daraus die weiteren Verdünnungen (Verd.) anzusetzen, von denen jeweils 3,5  $\mu$ l auf die Platten aufgetropft wurden. Die Inkubation erfolgte für 42 h bei 37°C.

Um den Effekt von CgkK und dessen Varianten auf die Kaliumakkumulation der TK2309-Zellen zu untersuchen, wurde der interne Kaliumgehalt der rekombinanten Zellen, die in der Anwesenheit von 5 mM KCl und 1 mM IPTG über sechs Stunden kultiviert worden waren, bestimmt. Während *E. coli* WT-Zellen eine interne Kalium-Konzentration von *circa* 350 mM aufwiesen, konnten in den TK2309-Zellen nur Spuren von Kalium ermittelt werden (Abb. 3.17). Alle CgkK-Varianten vermittelten in den TK2309-Zellen eine interne Kaliumakkumulation zwischen 77 und 139 mM. Diese Ergebnisse stimmen mit dem ausbleibenden Wachstum der TK2309-Zellen und der *cgkK*-, *cgkK\_M137*- und *cgkK\_M137Stop*-vermittelten Komplementation dieses Wachstumsphänotyps in Flüssigkultur überein.



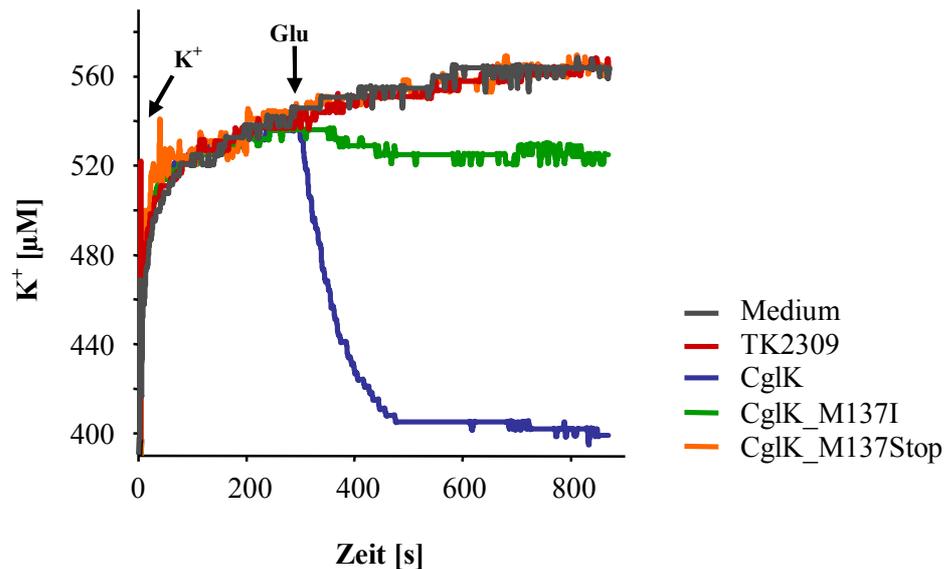
**Abb. 3.17: Flammenphotometrische Bestimmung des internen Kaliumgehalts.** Von *E. coli*-Zellen der Stämme WT (MG1655), TK2309 (TK), TK2309\_pTrc<sub>cg/K</sub>, TK2309\_pTrc<sub>cg/K</sub>M137I und TK2309\_pTrc<sub>cg/K</sub>M137Stop wurde nach sechsständiger Kultivierung in K<sub>5</sub>-Medium mit 1 mM IPTG die OD<sub>600</sub> und der interne Kaliumgehalt flammenphotometrisch bestimmt (n=3).

### 3.4.4 Kaliumaufnahmemessungen mit CgIK- und -Varianten in *E. coli* TK2309

Zur Validierung der durch CgIK und die CgIK-Varianten stattfindenden Kaliumakkumulation in den *E. coli* TK2309-Zellen, wurde mit Hilfe einer kaliumsensitiven Elektrode, die den Kaliumgehalt des Medium kontinuierlich misst, die Kaliumaufnahme der Zellen indirekt, zeitlich hochaufgelöst gemessen. Dazu wurden die jeweiligen kaliumgehungerten Zellen in 37°C warmen K<sub>0</sub>-Puffer für fünf Minuten inkubiert, 500 µM KCl hinzugefügt und nach weiteren fünf Minuten die Zellen durch die Zugabe von 1 mM Glukose energetisiert. Hierbei zeigte sich eine Abnahme der gemessenen externen Kaliumkonzentration im Ansatz in der Anwesenheit von TK2309<sub>cgIK</sub>-Zellen innerhalb der ersten Minute nach der Glukose-Zugabe, die auch in den folgenden zehn Minuten auf einem konstanten Niveau blieb. Im Vergleich zu den Kontrollmessungen ohne Zellen entsprach dies einer weiteren konstanten Kaliumaufnahme der Zellen (Abb. 3.18). Dahingegen war keine Abnahme der Kaliumkonzentration in den Ansätzen mit den Zellen TK2309 und TK2309<sub>cgIK</sub>\_M137Stop messbar. Für die rekombinanten Zellen TK2309<sub>cgIK</sub>\_M137I konnte ebenfalls eine Kaliumabnahme in der ersten Minute nach der Energetisierung gemessen werden, wobei die ermittelte Kaliumaufnahme der Zellen mit rund  $35 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{BTM}}^{-1}$  wesentlich geringer, als die der Zellen mit CgIK mit ungefähr  $380 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{BTM}}^{-1}$  war.

Somit ermöglichten in dem beobachteten Zeitraum sowohl das CgIK-, als auch das CgIK\_M137I-Protein den TK2309 *E. coli*-Zellen die Kaliumaufnahme bei niedrigen externen Kaliumkonzentration. Dabei sind aber unterschiedlich große Mengen an Kalium mit

unterschiedlichen Raten durch die beiden Proteine von den Zellen aufgenommen worden. Über den Membranteil CgIK\_M137Stop ohne KTN-Module fand hingegen bei der gewählten, niedrigen externen Kaliumkonzentration in dem Ansatz keine Kaliumaufnahme in dem Zeitraum der Messung statt.

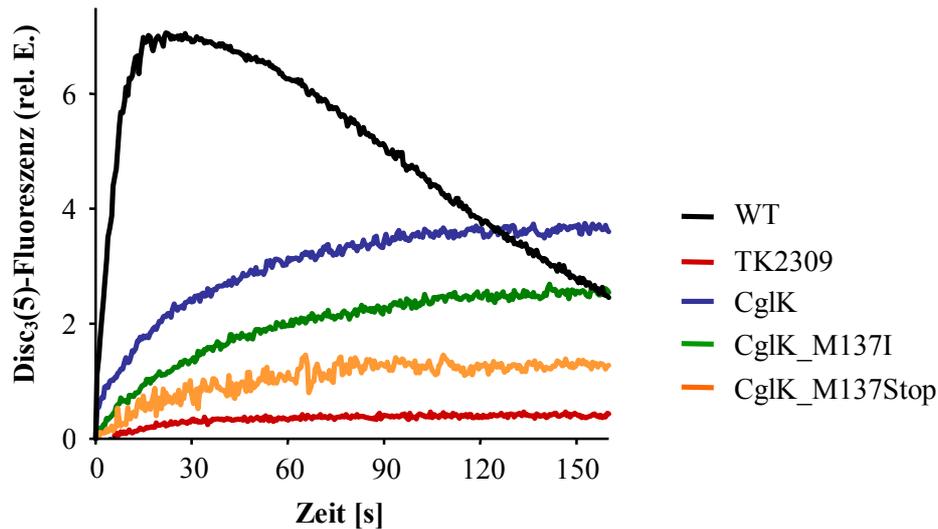


**Abb. 3.18: Kaliumaufnahmemessungen mit Hilfe einer kaliumsensitiven Elektrode.** Kaliumentleerte *E. coli*-Zellen der Stämme TK2309, TK2309\_pTrc\_cgIK, TK2309\_pTrc\_cgIKM137I und TK2309\_pTrc\_cgIKM137Stop wurden 5 min bei 37°C in  $K_0$ -Puffer inkubiert. Zum Zeitpunkt 0 s wurden 500  $\mu$ M KCl hinzugefügt ( $K^+$ ), weitere 5 min inkubiert und dann die Zellen durch die Zugabe von 1 mM Glukose (Glu) energetisiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Zellen (Medium).

### 3.4.5 Einfluss der Kaliumaufnahme auf das Membranpotential von *E. coli*-Zellen

Um die Kaliumaufnahme durch CgIK und die CgIK-Varianten bei einer höheren Kaliumkonzentrationen zu verifizieren, wurde die Veränderung des Membranpotentials, die mit einem Kaliumstrom einhergeht, in kaliumgehungerten *E. coli*-Zellen der Stämme WT (MG1655), TK2309, TK2309\_pTrc\_cgIK, TK2309\_pTrc\_cgIK\_M137I und TK2309\_pTrc\_cgIK\_M137Stop nach der Zugabe von 150 mM KCl gemessen. Hierzu wurde der Fluoreszenzfarbstoff DiSC<sub>3</sub>(5) verwendet, der in Abhängigkeit vom Membranpotential in den Zellen akkumuliert wird, wobei sich das Fluoreszenzsignal aufgrund der räumlichen Nähe der Fluoreszenzlabel auslöscht. Bei den Zellen des WT kam es innerhalb von 30 s nach der Zugabe von 150 mM KCl aufgrund des zeitlichen Anstiegs des DiSC<sub>3</sub>(5)-Signals zu einem raschen Abfall des Membranpotentials (Abb. 3.19). Innerhalb von 150 s sank das Membranpotential aber wieder, was anhand des Abfalls des Fluoreszenzsignals

geschlussfolgert werden konnte. In dem Ansatz mit den Zellen des Stammes TK2309 wurde nach Kaliumzugabe nur ein sehr leichter Anstieg der Fluoreszenz gemessen. War hingegen das CglK-Protein vorhanden, stieg das Fluoreszenzsignal nach der Kaliumzugabe innerhalb von 90 s langsamer als beim WT an, und blieb auf einem konstanten Niveau.



**Abb. 3.19: Messungen der Veränderung des Membranpotentials von *E. coli*-Zellen.** Kaliumentleerte Zellen der Stämme WT (MG1655), TK2309, TK2309\_pTrc\_cglK, TK2309\_pTrc\_cglKM137I und TK2309\_pTrc\_cglK\_M137Stop wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiSC<sub>3</sub>(5) und 10 mM Glukose für 5 min inkubiert. Daraufhin wurden zum Zeitpunkt 0 s 150 mM KCl hinzugefügt und die Fluoreszenz gemessen.

Dies war ebenfalls in den Ansätzen mit den rekombinanten TK2309-Zellen erkennbar, die *cglK\_M137I* oder *cglK\_M137Stop* exprimierten, wobei das Niveau des Fluoreszenzsignals mit *CglK\_M137Stop* tiefer als das mit *CglK\_M137I* war, welches wiederum unter dem mit dem *CglK*-Protein lag. Um die Proteinmenge der unterschiedlichen *CglK*-Varianten aus den Ansätzen zu ermitteln, wurden die entsprechenden Zellysate in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend ein Western Blot durchgeführt (siehe Anhang Abb. 6.2). Die Proteinmengen von *CglK* und *CglK\_M137I* waren annähernd gleich, während das *CglK\_M137Stop*-Protein in geringeren Mengen vorlag.

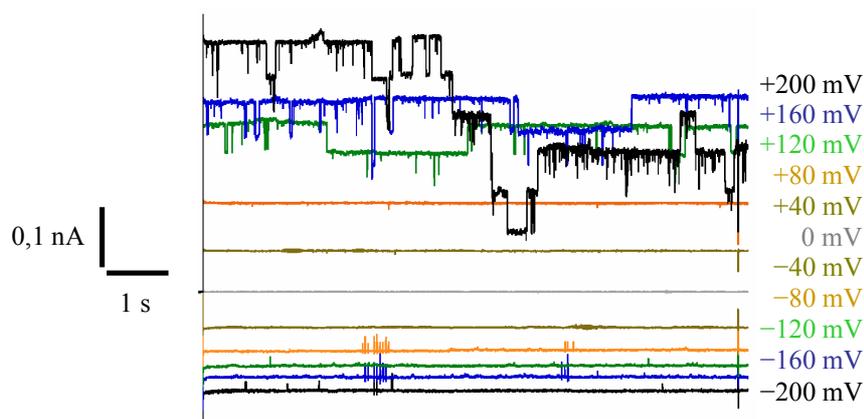
Somit wurde zum einen die Kaliumaufnahme durch die *CglK*- und die *CglK\_M137I*-Proteine validiert, und zum anderen konnte die Möglichkeit der Kaliumpermeation durch *CglK\_M137Stop* demonstriert werden.

### 3.5 Untersuchung der Einzelkanalaktivität von CgIK

Warum sich CgIK und die CgIK-Varianten, deren jeweilige Funktionalität in den physiologischen Untersuchungen gezeigt wurde, von einander unterscheiden, sollte in elektrophysiologischen Messungen analysiert werden. Dazu wurde zum einem CgIK aus der *E. coli*-Membran solubilisiert, aufgereinigt, in Proteoliposomen rekonstituiert und elektrophysiologisch untersucht. Zum anderem wurden elektrophysiologische Messungen von CgIK in *E. coli* Sphäroplasten durchgeführt.

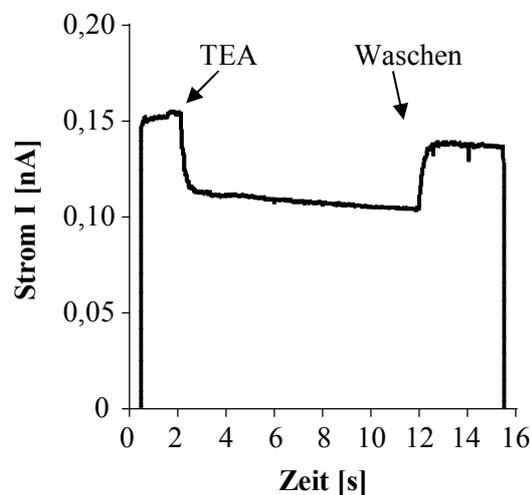
#### 3.5.1 Elektrophysiologische Untersuchungen von CgIK in Proteoliposomen (ZmnH Hamburg)

Zur näheren Charakterisierung von CgIK, unabhängig von anderen zellulären Proteinen, wurden in Zusammenarbeit mit dem Zentrum für molekulare Neurobiologie in Hamburg (ZmnH) elektrophysiologische *Patch-Clamp*-Untersuchungen an Proteoliposomen durchgeführt. Dazu erfolgte nach der heterologen Expression von *cgIK* in *E. coli* BL21, einer Membranpräparation mit anschließender Decylmaltosid (DM)-vermittelten Solubilisierung und Aufreinigung, die Rekonstitution von CgIK mit Asolektin unter nativen Bedingungen in Proteoliposomen. In den anschließenden Messungen traten bei Haltepotentialen zwischen  $-200$  und  $+80$  mV keine kanalspezifischen Ströme auf (Abb. 3.20). Ausschließlich bei  $+120$  mV oder höheren Haltepotentialen, die physiologischen Membranpotentialen mit umgekehrtem Vorzeichen entsprechen, wurden einzelne Kanalschaltungen beobachtet.



**Abb. 3.20: Exemplarische Stromspuren elektrophysiologischer Messungen von Proteoliposomen mit CgIK in der *inside-out*-Konfiguration.** Unterschiedliche Haltepotentiale (mV) wurden an die symmetrische Lösung im Bad und in der Pipette (150 mM KCl, 10 mM Hepes, 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 7,0) angelegt, und die Ströme (nA) über zehn Sekunden gemessen. Das Intervall zwischen den Potentialpulsen lag für 20 s bei 0 mV.

Für das in den Liposomen rekonstituierte CgIK-Protein konnte mit Hilfe der in Gleichung 14 angegebenen Zusammenhänge und linearer Regression eine Einzelkanalleitfähigkeit von  $364 \pm 19,7$  pS ( $n=6$ ) bei Haltepotentialen zwischen +120 und +200 mV bestimmt werden. Desweiteren konnte der Kaliumstrom durch den aktiven CgIK-Kanal teilweise durch die Zugabe von 50 mM Tetraethylammonium (TEA), das spezifisch den Kaliumselektivitätsfilter blockiert (Yellen, 1987), inhibiert werden (Abb. 3.21). Eine Auswaschung von TEA konnte die Inhibition des Kaliumstromes nahezu vollständig aufheben. Die rekonstituierten CgIK-Proteine aus *C. glutamicum* zeigten somit in Proteoliposomen ausschließlich bei hohen negativen Membranpotentialen kaliumspezifische Kanalaktivitäten. Da der Verlust der separaten KTN-Proteine an dem CgIK-Komplex in diesen Messungen nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde CgIK und der Einfluss der KTN-Module im Folgenden durch elektrophysiologische Messungen an *E. coli* Sphäroplasten näher untersucht.

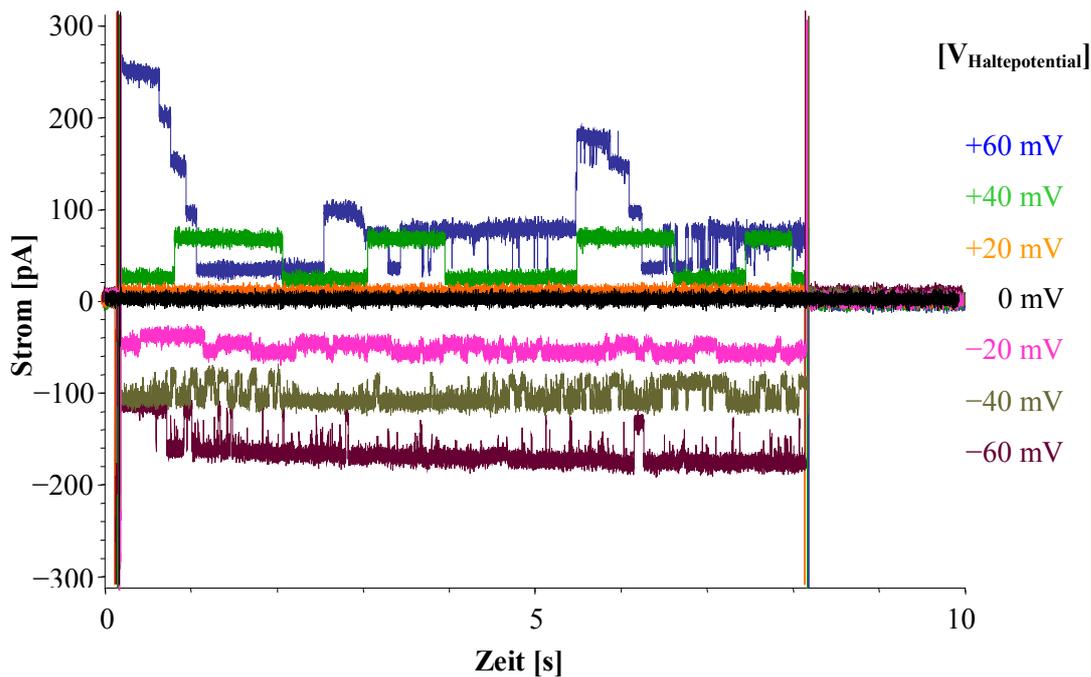


**Abb. 3.21: Reversibilität einer TEA-vermittelten Inhibition der Aktivität von CgIK-Kaliumkanälen.** Zeitliche Darstellung des gemessenen Stroms durch CgIK bei einem Haltepotential von +200 mV nach der Zugabe von 50 mM TEA und anschließendem Auswaschprozess. Die Pipettenlösung enthielt 150 mM KCl, 10 mM Hepes (pH 7,0), 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  und 1 mM EDTA. Die Badlösung enthielt 150 mM KCl, 10 mM Hepes (pH 7,0), 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  und zeitweise 50 mM TEA oder 50 mM NaCl.

### 3.5.2 Elektrophysiologische Untersuchungen von CgIK an *E. coli*-Sphäroplasten (IMS Aberdeen)

Um den CgIK-Kanal als vollständigen Komplex untersuchen zu können, wurden in Zusammenarbeit mit dem Institute of Medical Sciences (IMS) in Aberdeen elektrophysiologische Messungen mit *E. coli*-Sphäroplasten durchgeführt. Dazu wurde der *E. coli* Stamm TK2309 ausgewählt, da dieser zum einen über keine eigenen Kaliumtransporter verfügt, und zum anderen an TK2309-Sphäroplasten bei Potentialen

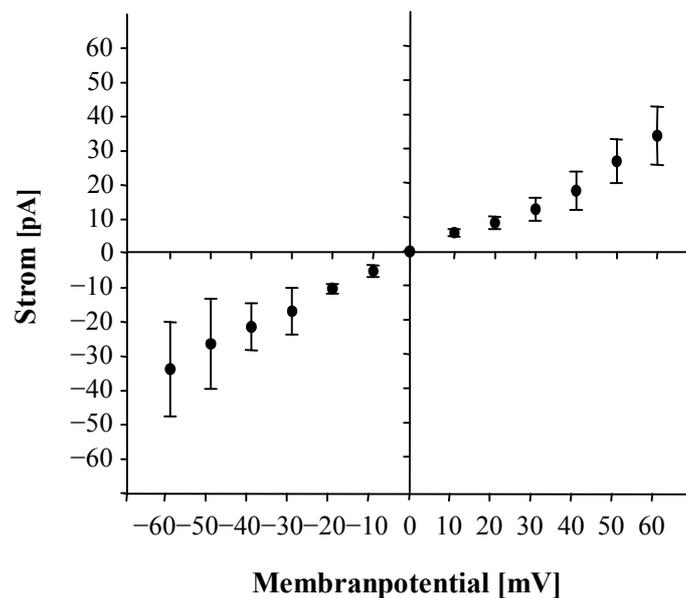
zwischen  $-60$  und  $+60$  mV keine Kanalaktivitäten gemessen wurden (Daten nicht gezeigt). Bei Messungen an *E. coli*-TK2309\_pTrc\_cglK-Sphäroplasten in symmetrischer Anwesenheit von 150 mM KCl, wurden bei angelegten Potentialen zwischen  $-60$  und  $+60$  mV Kanalaktivitäten gemessen (Abb. 3.22).



**Abb. 3.22: Exemplarische Ströme von Messungen eines *E. coli* TK2309\_pTrc\_cglK-Sphäroplasten als excised patch in der inside-out-Konfiguration.** Unterschiedliche Haltepotentiale (mV) wurden im Anschluss an eine 20 ms lange Hyperpolarisation auf  $-100$  mV an die symmetrische Lösung im Bad und in der Pipette (150 mM KCl, 5 mM Hepes, 90 mM MgCl<sub>2</sub> 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) angelegt, und die Ströme über acht Sekunden gemessen.

Um die Kaliumspezifität dieser gemessenen Aktivitäten des CglK-Komplexes zu untersuchen, wurden entsprechende elektrophysiologische Untersuchungen in der Abwesenheit von Kalium mit 150 mM NaCl durchgeführt, die keine Kanalaktivitäten zeigten (Daten nicht gezeigt). Die Auswertung der gemessenen Ströme zeigte, dass die CglK-Aktivitäten zwischen  $-60$  und  $+60$  mV spannungsabhängig waren (Abb. 3.23). Ebenfalls erkennbar war, dass die Variationen der gemessenen Ströme der Kanalaktivitäten bei höheren, bzw. tieferen Potentialen anstiegen. Eine exakte Berechnung der Leitfähigkeit von CglK war aus diesem Grund nicht möglich, vielmehr konnte für den negativen Membranpotentialbereich ein Wert von rund 570 pS durch lineare Regressionen gemittelt werden. Bezüglich der bevorzugten Stromdurchlassrichtung, der sogenannten Rektifizierung, konnte keine eindeutige Aussage getroffen werden, da der Wert der Einzelkanalleitfähigkeit für den positiven Membranpotentialbereich mit der Fehlerabschätzung in dem Bereich des Wertes für den

negativen Membranpotentialbereich lag. Desweiteren wurde untersucht, welche minimale Kaliumkonzentration für das Auftreten dieser Ströme notwendig ist. In der Anwesenheit von 30 mM KCl konnten keine Kanalaktivitäten gemessen werden, die jedoch ab einer Konzentration von 50 mM KCl auftraten (Daten nicht gezeigt). Somit handelt es sich bei dem CglK-Proteinkomplex bei Potentialen zwischen  $-60$  und  $+60$  mV um einen kaliumspezifischen, spannungsabhängigen Kanal.

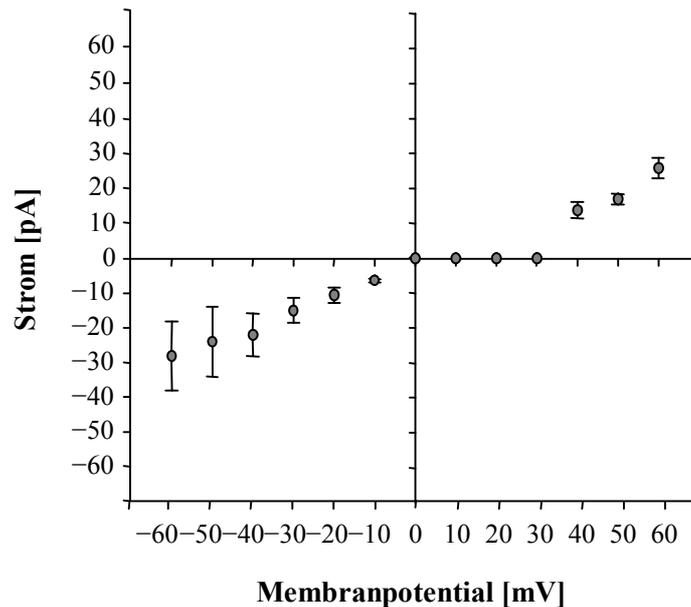


**Abb. 3.23: Einzelkanalaktivitäten von CglK.** In Anwesenheit von 150 mM KCl wurden Einzelkanalereignisse von CglK bestimmt, gemittelt und gegen die angelegten Membranpotentiale aufgetragen (Anzahl der *patches*  $n=12$ ).

### 3.5.3 Elektrophysiologische Untersuchungen von CglK mit veränderter Anzahl an KTN-Modulen

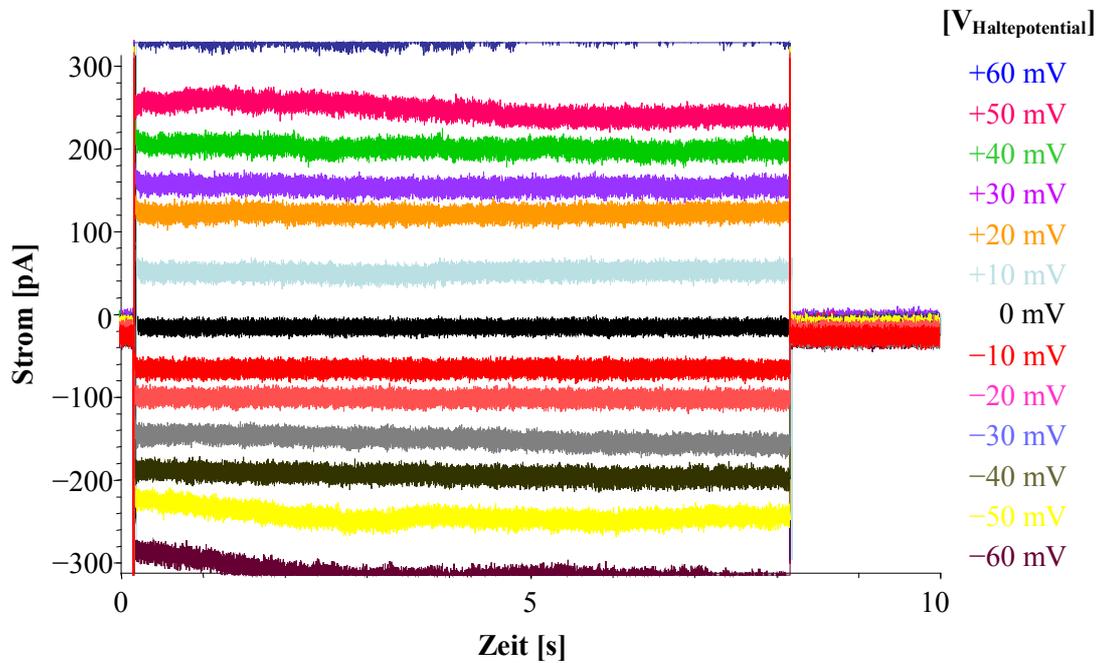
Zur Untersuchung des Einflusses der C-terminalen KTN-Domänen und der KTN-Proteine auf die Kanalaktivität von CglK wurden elektrophysiologische Untersuchungen der Varianten CglK\_M137I und CglK\_M137Stop in *E. coli*-Sphäroplasten durchgeführt. Untersuchungen der *E. coli* TK2309\_cglKM137I-Sphäroplasten zeigten in der Anwesenheit von 150 mM KCl bei Membranpotentialen zwischen  $-60$  und  $-10$  mV, sowie zwischen  $+40$  und  $+60$  mV spannungsabhängige Einzelkanalaktivitäten (Abb. 3.24). Diese Kanalaktivitäten waren kaliumspezifisch und traten nicht in Anwesenheit von 150 mM NaCl auf (Daten nicht gezeigt). Wie bei CglK traten auch bei CglK\_M137I bei niedrigeren Membranpotentialen vermehrt variable Einzelkanalaktivitäten auf, die für diesen Bereich nur eine lineare Mittlung

der Leitfähigkeit mit einem Wert von rund 400 pS zuließ. Für den positiven Membranpotentialbereich konnte bezüglich der Leitfähigkeit von CgIK\_M137I kein Wert ermittelt werden. Somit fungierte CgIK beim Verlust seiner separaten löslichen KTN-Proteine immer noch als kaliumspezifischer Kanal, jedoch scheint seine Leitfähigkeit reduziert zu sein.

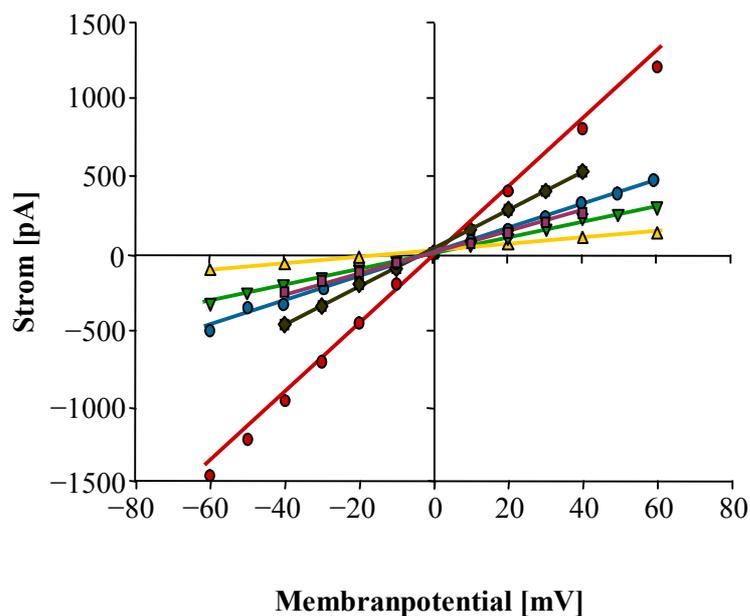


**Abb. 3.24.: Einzelkanalaktivitäten von CgIK\_M137I.** In Anwesenheit von 150 mM KCl wurden Einzelkanalereignisse von CgIK\_M137I bestimmt, gemittelt und gegen die angelegten Membranpotentiale aufgetragen (Anzahl der patches n=11).

Elektrophysiologische Untersuchungen von *E. coli* TK2309\_cgIK\_M137Stop-Sphäroplasten zeigten bei Potentialen zwischen -60 und +60 mV kaliumspezifische Ströme, deren Größe direkt proportional zu der applizierten Spannung war, jedoch keine Schaltereignisse beinhalteten (Abb. 3.25). Eine Berechnung der Leitfähigkeit war nicht möglich, da die gemessenen Ströme eines patches zwar im linearen Zusammenhang zur Spannung standen, aber die resultierenden Steigungen aufgrund der unterschiedlichen Anzahl der jeweils vermessenen aktiven CgIK\_M137Stop-Proteine im jeweiligen patch variierten (Abb. 3.26). Diese direkte Proportionalität des Stromflusses war unabhängig vom Vorzeichen der angelegten Spannung, so dass keine Rektifizierung vorlag. Somit stellt CgIK\_M137Stop einen frei für Kaliumionen passierbaren Permeationsweg durch die Membran dar. Wie die KTN-Proteine die Aktivität des CgIK-Kanals beeinflussen können, wurde in den folgenden biochemischen Ansätzen untersucht.



**Abb. 3.25: Exemplarische Ströme von Messungen eines *E. coli* TK2309\_cglK\_M137Stop-Sphäroplasten als excised patch in der inside-out Konfiguration** Unterschiedliche Haltepotentiale (mV) wurden im Anschluss an eine 20 ms lange Hyperpolarisation auf -100 mV an die symmetrische Lösung im Bad und der Pipette (150 mM KCl, 5 mM Hepes, 90 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) angelegt, und die Ströme über acht Sekunden gemessen.



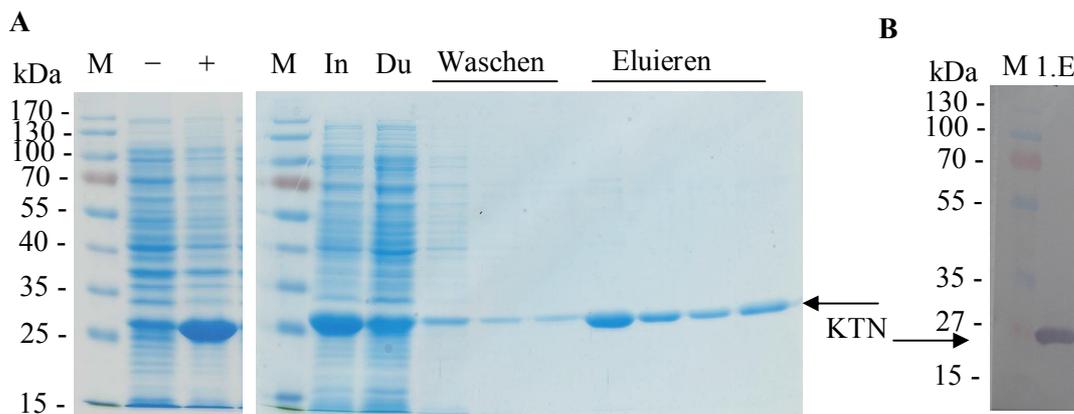
**Abb. 3.26: Darstellung der durch CglK\_M137Stop vermittelten Ströme in unterschiedlichen patches.** Die elektrophysiologisch gemessenen Ströme in der Anwesenheit von 150 mM KCl wurden gegen die angelegten Membranpotentiale aufgetragen. Den Aktivitäten eines patches wurde jeweils eine Farbe zugeordnet, wobei die Beziehung zwischen gemessenem Strom und angelegter Membranspannung durch lineare Regression visualisiert wurde (n=6).

### 3.6 Biochemische Charakterisierung von KTN-Modifikationen und deren Einfluss unter *in vivo* Bedingungen

Während im MthK-Modell eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung mit dazugehöriger Bindestelle bekannt ist (Jiang *et al.*, 2002b), diese jedoch nicht in der Sequenz von CgIK vorkommt, wurde untersucht inwiefern die KTN-Untereinheiten unterschiedliche Zustände der Zelle, bzw. des Cytoplasmas sensieren können.

#### 3.6.1 Analyse der Oligomerisierung der KTN-Proteine in Abhängigkeit vom pH-Wert

Um zu untersuchen, ob ein niedriger pH-Wert, bei dem die Kaliumaufnahme durch CgIK in *C. glutamicum* notwendig ist, die putative Komplexbildung der cytoplasmatischen KTN-Proteine mit ihrer möglichen regulatorischen Funktion beeinflusst, wurden sie unabhängig von den Transmembrandomänen exprimiert. Dazu wurde die *cglK*-Sequenz ab dem 409. Nukleotid (internes Startcodon) mit der Sequenz für einen C-terminalen His-Tag in den Vektor pet-52b kloniert, und im *E. coli*-Stamm BL21 heterolog exprimiert. Die Aufreinigung des 27 kDa großen KTN-Proteins erfolgte affinitätschromatographisch im *batch*-Verfahren (Abb. 3.27). Anschließend wurden die aufgereinigten KTN-Proteine mit Hilfe einer *HiTrap DeSalting*-Säule entsalzt, und mit Hilfe von Gelfiltrationen über die Säule Superdex 200 10/300 ihre Oligomerisierungszustände bei unterschiedlichen pH-Werten analysiert (Abb. 3.28).



**Abb. 3.27: Heterologe Expression und Aufreinigung des löslichen KTN-Proteins.** Der cytoplasmatische KTN-Sequenzbereich von *cglK* (ab Nukleotid 409) wurde in den Vektor pet-52b mit der Sequenz für einen C-terminalen His-Tag kloniert, und im *E. coli*-Stamm BL21 exprimiert ( $\pm 1$  mM IPTG). Die Aufreinigung erfolgte affinitätschromatographisch im *batch*-Verfahren und wurde in einer 15% SDS-PAGE dokumentiert (A). Die erste Elution ist zusätzlich mittels eines Western Blots mit Anti-His-Antikörpern analysiert worden (B). I=Input (10 mM Imidazol), Du=Durchfluss (10 mM Imidazol), Waschungen (20 mM Imidazol), Elutionen (250, 500, 750, 750 mM Imidazol) und M=Marker. Mit den Pfeilen sind die KTN-Proteinbanden markiert.

Zur Bestimmung der KTN-Proteinkomplexgröße wurde die analytische Gelfiltrationssäule mit Hilfe des Gelfiltration Kalibrierungs-Kits HMW (GE Healthcare) geeicht, so dass durch Auftragen des Verteilungskoeffizienten  $K_{AV}$  gegen den Logarithmus des Molekulargewichts (MG) eine lineare Kalibrierungsfunktion erstellt werden konnte (Gleichung 15).

$V_e$  = Elutionsvolumen (Probe)

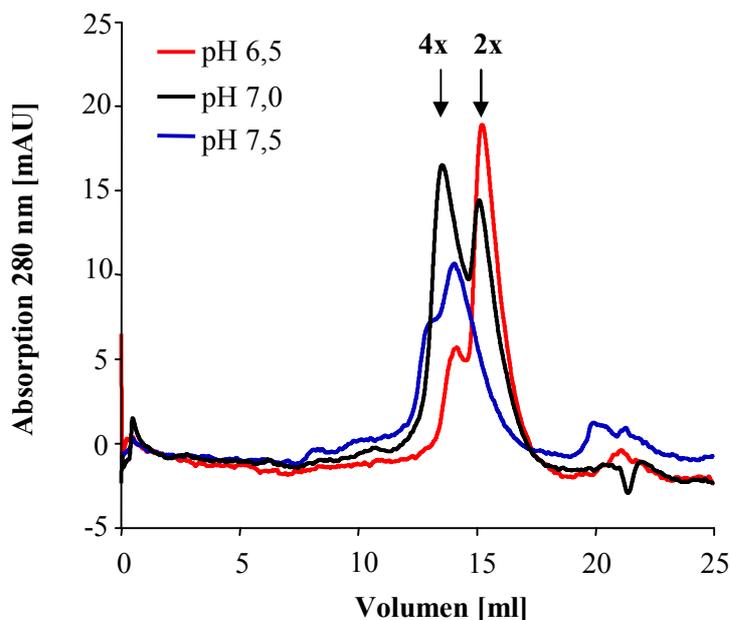
$V_0$  = Totvolumen (8,43 ml; Elutionsvolumen von Blue Dextran);

$V_c$  = Bettvolumen (24 ml; Elutionsvolumen von Aceton)

$$K_{AV} = (V_e - V_0) / (V_c - V_0)$$

$$\text{LN}(\text{MG}) = -7,0492 K_{AV} + 14,008 \quad (\text{Gleichung 15})$$

Die Gelfiltration des KTN-Proteins bei pH 6,5 ergab einen nicht vollständig aufgetrennten Peak mit einem Retentionsvolumen von 15,21 ml (Abb. 3.28). Bei neutralem pH von 7,0 traten zwei fast gleich große Peaks mit Retentionsvolumina von 13,54 ml, bzw. 15,11 ml auf. Bei pH 7,5 war ein nicht komplett diskriminierter Peak bei 13,19 ml zu erkennen.



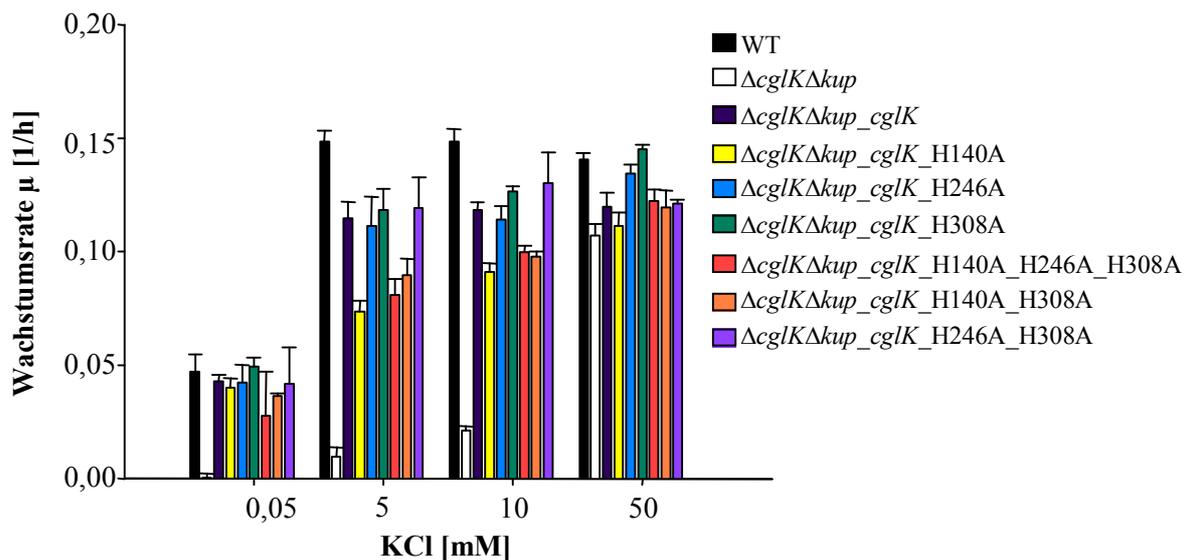
**Abb. 3.28: Analytische Gelfiltration der KTN-Proteine bei unterschiedlichen pH-Werten** Die aufgereinigten 27 kDa großen KTN-Proteine wurden mittels der Säule Superdex 200 10/300 bei unterschiedlichen pH-Werten (50 mM Mops; pH 6,5; 7,0; 7,5) ausschlusschromatographisch analysiert (4 x = tetramerer KTN-Komplex; 2 x = dimerer KTN-Komplex).

Der Proteinpeak bei pH 6,5 entsprach einer Größe von 56 kDa und war somit ein dimerer KTN-Proteinkomplex. Die beiden bei pH 7,0 detektierten Peaks entsprachen mit ihren Größen von 120 kDa und 60 kDa einem Tetramer, bzw. Dimer aus KTN-Proteinen. Bei pH 7,5 konnte das Retentionsvolumen des detektierten Peaks einer Größe von 140 kDa und

somit ebenfalls einem Komplex aus vier KTN-Proteinen zugeordnet werden. Die leichte Verschiebung des Peaks vom Tetramer war durch die Kalibrierung bedingt, die bei pH 7,0 durchgeführt worden war. Somit ist die Komplexbildung, bzw. der Oligomerisierungsgrad der KTN-Proteine durch den pH-Wert beeinflussbar. Da die KTN-Proteine somit den pH-Wert detektieren können und Histidinreste mit ihrem  $pK_S$  von 6,0 dafür geeignet sein können, wurden alle drei Histidine in der KTN-Sequenz auf ihre Funktion in CgIK hin untersucht, wobei mit dem folgenden physiologischen *Screening*-Verfahren begonnen wurde.

### 3.6.2 Untersuchungen zur pH-sensorischen Funktion von KTN

Um die mögliche Funktion der Histidinreste im KTN-Bereich als pH-Sensoren *in vivo* zu untersuchen, wurden Basenpaaraustausche in der Sequenz von *cglK* durchgeführt, die die jeweiligen Codons für Histidine in die für Alanine umwandelten. In der Aminosäuresequenz von CgIK befinden sich drei Histidine H140, H246 und H308, die alle im Bereich von KTN liegen. Dabei wurden neben einzelnen Histidinen auch Histidine in Kombination ausgetauscht. Die mutierten *cglK*\_pEKEEx2-Plasmide wurden dann in *C. glutamicum*-Zellen des Stammes  $\Delta cglK\Delta kup$  durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG exprimiert und Wachstumsexperimente bei pH 6,5 mit unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen in MTP durchgeführt (Abb. 3.29).



**Abb. 3.29: Einfluss der Histidine von KTN auf die CgIK-vermittelte Komplementation des pH-sensitiven Wachstumsphänotyps von *C. glutamicum* Stamm  $\Delta cglK\Delta kup$ .** Zellen der Stämme WT\_pEKEEx2,  $\Delta cglK\Delta kup\_pEKEEx2$ ,  $\Delta cglK\Delta kup\_pEKEEx2\_cglK$ ,  $\Delta cglK\Delta kup\_pEKEEx2\_cglK\_H140A$ ;  $\Delta cglK\Delta kup\_pEKEEx2\_cglK\_H246A$ ;  $\Delta cglK\Delta kup\_pEKEEx2\_cglK\_H308A$ ;  $\Delta cglK\Delta kup\_pEKEEx2\_cglK\_H140A\_H246A\_H308A$ ;  $\Delta cglK\Delta kup\_pEKEEx2\_cglK\_H140A\_H308A$  und  $\Delta cglK\Delta kup\_pEKEEx2\_cglK\_H246A\_H308A$  wurden bei pH 6,5 mit 0,05; 5; 10 oder 50 mM KCl sowie 1 mM IPTG in MTP kultiviert und die Wachstumsraten bestimmt (n=8).

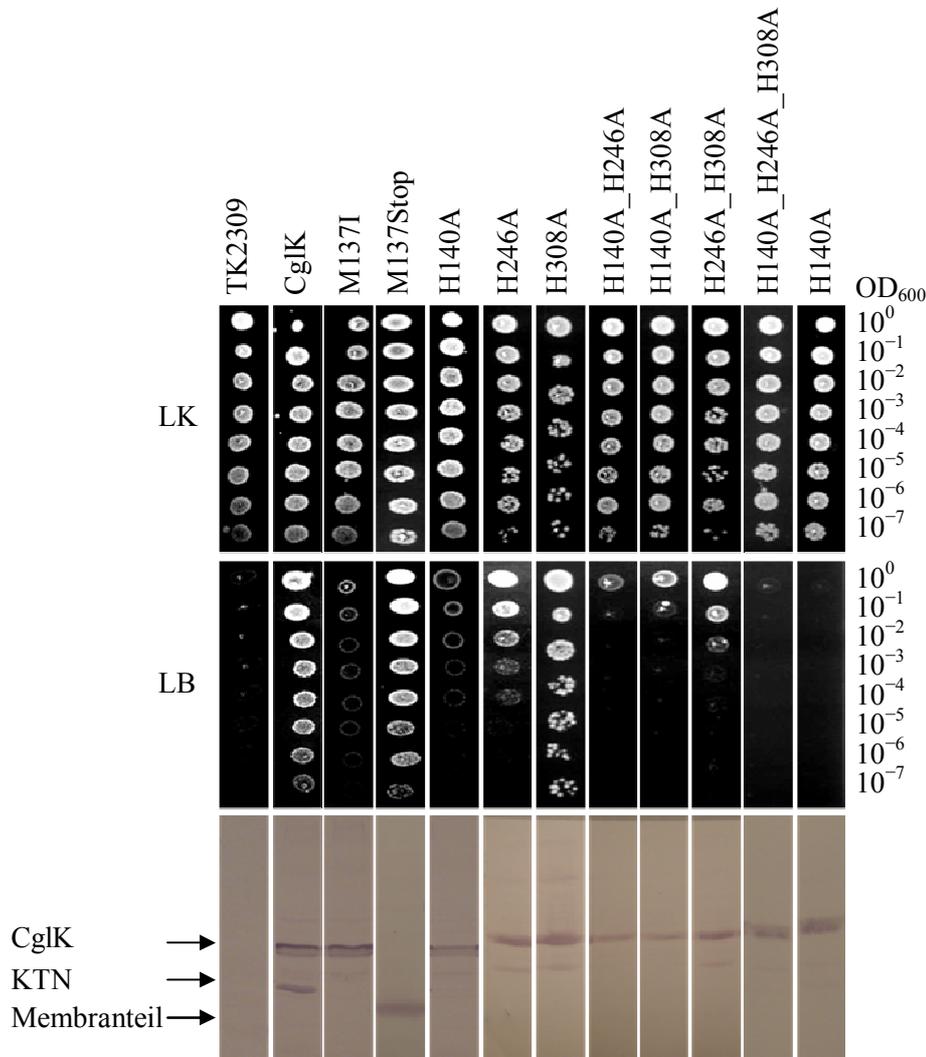
Mutationen von H246 und H308 hatten sowohl als Einzelmutation, als auch in Kombination, keinen Effekt auf die *cglK*-abhängige Komplementation des pH-sensitiven Wachstumsphänotyps der  $\Delta cglK\Delta kup$ -Mutante. Der Austausch des Histidins 140 in ein Alanin ließ hingegen keine vollständigen Komplementation zu. Vielmehr zeigte diese Mutante einen intermediären Phänotyp, der besser als der Deletionsstamm, aber schlechter als die *cglK*-Komplementation wuchs. Auch in Kombination mit Mutationen der anderen Histidine war dieser Phänotyp erkennbar. Somit hatte nur die Mutation des Histidins 140 in ein Alanin einen negativen Effekt auf die Funktionalität von CglK in *C. glutamicum*.

Da kein Nachweis des mutierten CglK-Proteins in *C. glutamicum* möglich war, wurde die Bedeutung der Histidinreste auf die Funktionalität von CglK zusätzlich in *E. coli* TK2309-Zellen untersucht, um gleichzeitig die heterologen Proteine zu detektieren. Dazu wurden Basenpaaraustausche in der Sequenz von pTrc\_ *cglK* eingefügt, die die jeweiligen Histidin-Codons in die für Alanine mutierten. Das Wachstum der TK2309-Zellen, welche die mutierten Plasmide beinhalten, wurde mit Hilfe von Tropfsteinen auf IPTG-haltigen kaliumarmen LB- und kaliumreichen LK-Agarplatten untersucht, während die Genexpression mittels Western Blot analysiert wurde (Abb. 3.30). Die Mutation des Histidins 140 in ein Alanin führte, wie in der *C. glutamicum*-Mutante, zu einer unvollständigen Komplementation des kaliumabhängigen Wachstumsphänotyps. Dabei zeigte der Western Blot, dass in dieser H140A-*E. coli*-Mutante kein separates KTN-Protein exprimiert wurde (Abb. 3.30).

Der Austausch von Histidin 140 in die positiv geladene Aminosäure Lysin führte zu keiner funktionellen Komplementation des TK2309 Phänotyps durch das mutierte CglK. Die Mutation H246A zeigte eine verringerte Komplementation, während H308A nur einen schwachen negativen Effekt auf die Wachstumskomplementation von TK2309 durch CglK hatte. Dabei wurden die separaten KTN-Proteine jeweils in geringeren Mengen als in TK2309\_ *cglK* nachgewiesen. Somit verhindert die Mutationen des Histidins 140 sowohl in *C. glutamicum*, als auch in *E. coli*, die Komplementation der jeweiligen kaliumsensitiven Wachstumsphänotypen wahrscheinlich aufgrund der eingeschränkten Expression des KTN-Abschnitts ein.

Zur weiteren biochemischen Untersuchung der Funktion des Histidins 140 *in vitro* wurde dieses im separaten, löslichen KTN-Protein in ein Alanin ausgetauscht. Der mutierte *cglK*-Genabschnitt wurde im *E. coli*-Stamm BL21 exprimiert und das His-Tag-markierte Protein affinitätschromatographisch im *batch*-Verfahren aufgereinigt (Daten nicht gezeigt). In Gelfiltrationsanalysen mit unterschiedlichen pH-Werten und Salzkonzentrationen aggregierten die aufgereinigten KTN-H140A-Proteine, so dass die Komplexgröße nicht

bestimmt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Somit beeinflusste die Mutation der *cglK*-Sequenz, die zum Austausch des Histidins 140 in ein Alanin führte, die Expression und Stabilität des KTN-Proteins.



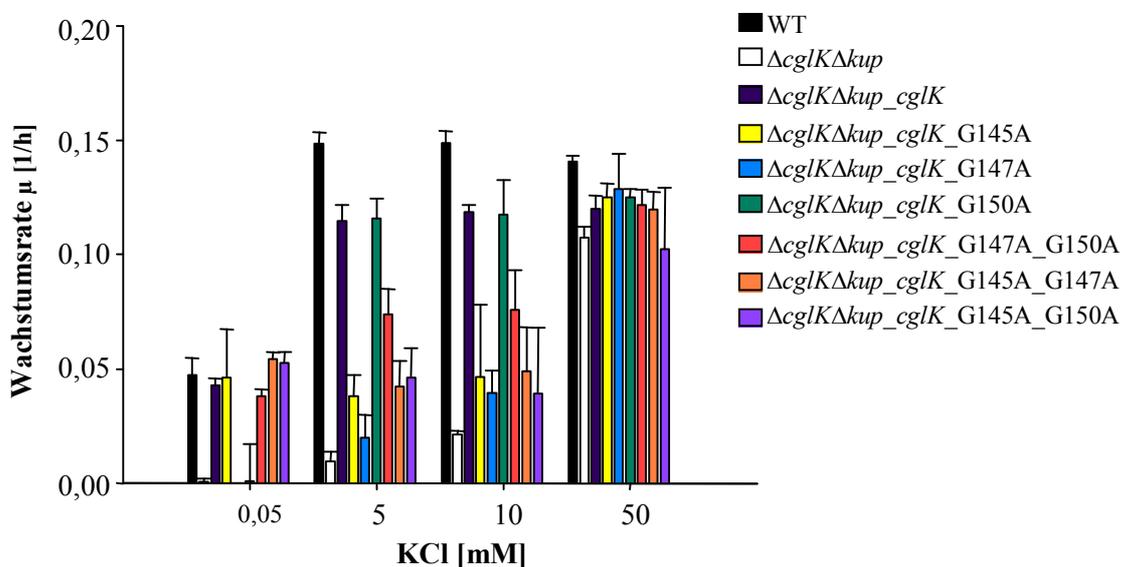
**Abb. 3.30: Heterologe Expression und Tropfteste von *cglK*-Varianten im *E. coli* Stamm TK2309.** Tropfteste von kaliumentleerten, rekombinanten TK2309-Zellen mit *cglK*, *cglK*\_H140A, *cglK*\_H246A, *cglK*\_H308A, *cglK*\_H140A, *cglK*\_H140A\_H246A, *cglK*\_H140A\_H308A, *cglK*\_H246A\_H308A oder *cglK*\_H140A\_H246A\_H308A auf kaliumarmen LB- und kaliumreichen LK-Agarplatten mit jeweils 1 mM IPTG. Die Expression der His-markierten *cglK*-Varianten wurde mittels Western Blots der Gesamtproteinlysate mit Anti-His-Antikörpern untersucht.

### 3.6.3 Untersuchungen zur Bedeutung des Nukleotid-Bindemotives in KTN

Für den MthK-Kanal ist ein ligandenabhängiger *gating*-Mechanismus beschrieben, in dem Calcium an die RCK-Proteine bindet (Jiang *et al.*, 2002b). Ob ein ähnlicher Mechanismus in CgIK vorliegen könnte, wurde im Folgenden untersucht. Dazu wurde der Einfluss des Rossmann Fold Motivs in der KTN-Sequenz mit dem glycinreichen, putativen Nukleotid-

Bindemotiv GXGXXG (G145-G150) auf die Funktionalität von CglK durch Austausch der Glycine in Alanine in einem physiologischen *Screening*-Verfahren analysiert.

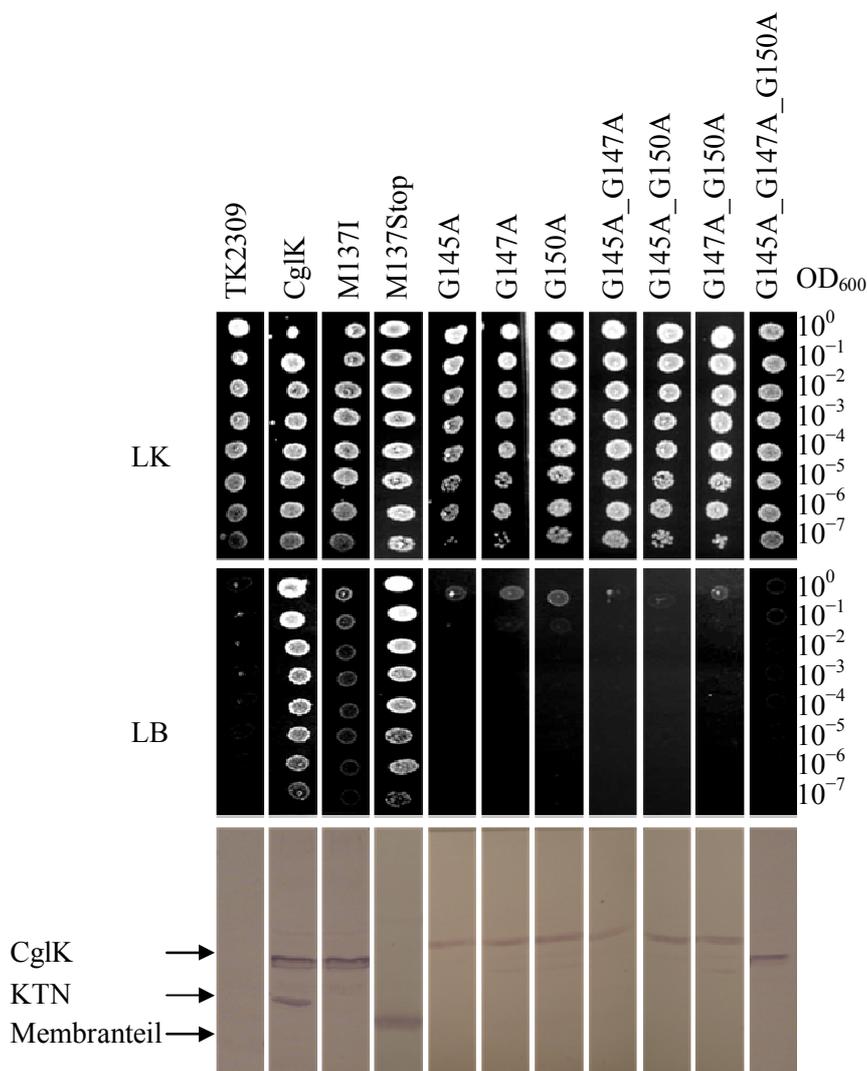
Die mutierten *cglK*-Konstrukte wurden im *C. glutamicum*-Stamm  $\Delta cglK\Delta kup$  exprimiert und Wachstumsexperimente mit 1 mM IPTG in MTP bei pH 6,5 mit für den Phänotyp selektiven Kaliumkonzentrationen durchgeführt. Der separate oder kombinierte Austausch des ersten und zweiten Glycins (G145; G147) führte dazu, dass der Wachstumsphänotyp der  $\Delta cglK\Delta kup$ -Mutante nicht durch die mutierten *cglK*-Sequenzen komplementiert wurde (Abb. 3.31). Der Austausch des dritten Glycins (G150) in CglK hatte hingegen keinen Effekt auf die Komplementation des Wachstumsphänotyps der  $\Delta cglK\Delta kup$ -Mutante.



**Abb. 3.31: Einfluss der Glycine im putativen Nukleotidbindemotiv auf die CglK-vermittelte Komplementation des pH-sensitiven Wachstumsphänotyps von *C. glutamicum*  $\Delta cglK\Delta kup$ .** Zellen der Stämme WT\_pEKEEx2,  $\Delta cglK\Delta kup\_pEKEEx2$ ,  $\Delta cglK\Delta kup\_pEKEEx2\_cglK$ ,  $\Delta cglK\Delta kup\_pEKEEx2\_cglK\_G145A$ ;  $\Delta cglK\Delta kup\_pEKEEx2\_cglK\_G147A$ ;  $\Delta cglK\Delta kup\_pEKEEx2\_cglK\_G150A$ ;  $\Delta cglK\Delta kup\_pEKEEx2\_cglK\_G147A\_G150A$ ;  $\Delta cglK\Delta kup\_pEKEEx2\_cglK\_G145A\_G147A$ ;  $\Delta cglK\Delta kup\_pEKEEx2\_cglK\_G145A\_G150A$  wurden bei pH 6,5 mit 0,05; 5; 10 oder 50 mM KCl sowie 1 mM IPTG bei pH 6,5 in MTP kultiviert, und die Wachstumsraten bestimmt (n=8).

Diese Mutationen für die Aminosäureaustausche wurden ebenfalls in das Plasmid pTrc\_ *cglK* eingefügt, um ihre Effekte auf die heterologe Expression und Funktionalität von *cglK* im *E. coli*-Stamm TK2309 zu untersuchen. Dabei führte der alleinige Austausch eines Glycins (G145; G147 oder G150) in ein Alanin schon dazu, dass der Wachstumsphänotyp von TK2309 nicht mehr durch die mutierte *cglK*-Sequenz auf den kaliumarmen LB-Platten komplementiert wurde (Abb. 3.32). Dies setzte sich bei den kombinierten Austauschen der Glycine ebenfalls fort.

Bezüglich der Expression war bei allen mutierten *cglK*-Sequenzen die Menge an separatem KTN-Protein reduziert, bzw. war es nicht mehr detektierbar. Die Mutationen innerhalb der glycinreichen Sequenz von CglK schränkten somit sowohl in *C. glutamicum*, als auch in *E. coli* die Möglichkeit kalium-sensitive Wachstumsphänotypen von entsprechenden Mutanten durch die varrierten CglK-Proteine zu komplementieren, ein. Während dieser Effekt in *E. coli* bei allen drei Glycinen beobachtet wurde, gab es in *C. glutamicum* die Ausnahme, dass der Austausch des Glycins 150 in ein Alanin keinen Effekt hatte (Daten nicht gezeigt). Eine genaue Untersuchung der Funktion des Nukleotid-Bindemotivs war somit aufgrund der veränderten Menge des KTN-Proteins nicht möglich.



**Abb. 3.32: Heterologe Expression von *cglK*-Varianten im *E. coli* Stamm TK2309.** Tropfteste von kaliumentleerten Zellen der *E. coli*-Stämme TK2309 mit den Plasmiden: pTrcYH\_*cglK*, pTrcYH\_*cglK*\_G145A, pTrcYH\_*cglK*\_G147A, pTrcYH\_*cglK*\_G150A, pTrcYH\_*cglK*\_G145A\_G147A, pTrcYH\_*cglK*\_G147A\_G150A, pTrcYH\_*cglK*\_G145A\_G147A\_H150A und pTrcYH\_*cglK*\_G145A\_G150A auf kaliumarmen LB- und kaliumreichen LK-Agarplatten mit jeweils 1 mM IPTG. Die Expression der His-markierten *cglK*-Varianten wurde mittels Western Blot mit Anti-His-Antikörpern analysiert.

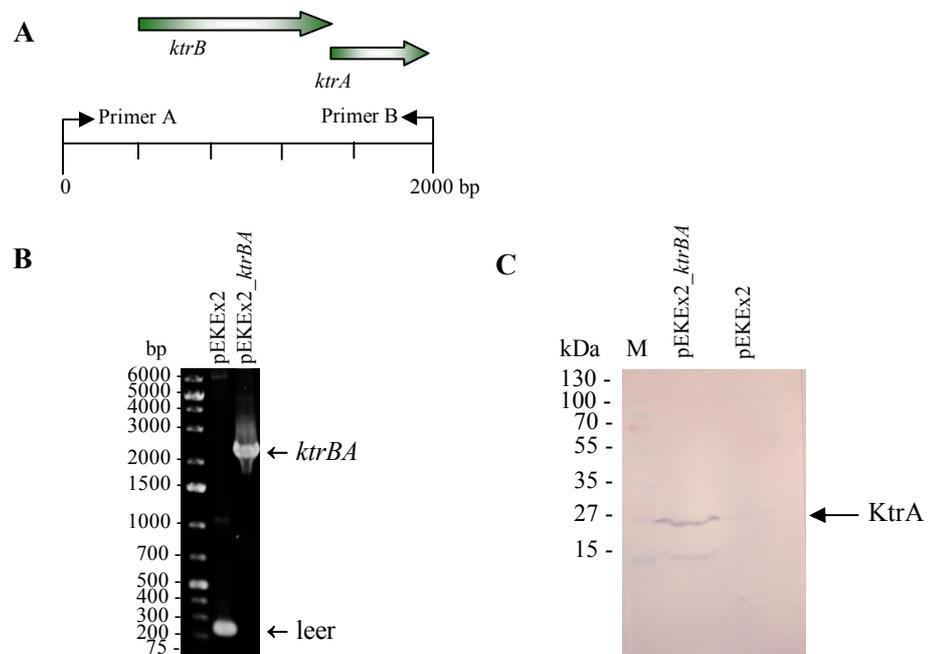
### 3.7 Einfluss von Kanal- und Transporter-vermittelter Kaliumaufnahme auf die Stressanpassung von *C. glutamicum*

#### 3.7.1 Heterologe Expression von *ktrBA* aus *C. jeikeium* in *C. glutamicum*

Um zu untersuchen, ob und unter welchen Bedingungen die alleinige Kaliumaufnahme durch den Kaliumkanal CgIK in *C. glutamicum* ausreichend ist, sowie wann und warum ein aktiver Kaliumtransporter von Vorteil ist, wurde nach einem geeigneten Carrier zur heterologen Expression gesucht. Dabei wurde das in Actinobakterien häufig vorkommende sekundär aktive KtrAB-System ausgewählt, und die entsprechenden Gensequenzen aus *C. diphtheriae* bzw. *C. jeikeium* in *C. glutamicum* heterolog exprimiert.

Das aktive Kaliumtransportsystem KtrAB aus *C. jeikeium* besteht aus zwei Untereinheiten, die durch die Gene *ktrB* (*jk0347*) und *ktrA* (*jk0348*) codiert werden (Abb. 3.33A). Diese wurden zusammen mit einem zusätzlichen Sequenzabschnitt von ungefähr 300 bp vor dem Startcodon und einem C-terminalen Strep-Tag codierenden Bereich mittels PCR amplifiziert, und in den Vektor pEKEx2 kloniert (Abb. 3.33B). Für die KtrB-Untereinheit wurden acht Transmembrandomänen und ein Molekulargewicht von 49 kDa vorhergesagt. Die KtrA-Untereinheit ist ein lösliches, 23 kDa großes Protein. Die heterologe Expression von *ktrBA* aus *C. jeikeium* in *C. glutamicum* wurde nach Induktion mit 0,5 mM IPTG in einem Western Blot dokumentiert, wobei eine Proteinbande des C-terminal Strep-markierten KtrA-Proteins auf der Höhe von 25 kDa sichtbar war (Abb. 3.33C). Die Klonierung, bzw. funktionelle Expression von *ktrBA* (*dip1930*, *dip1931*) aus *C. diphtheriae* war hingegen nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt), woraufhin weitere Ansätze mit diesem Konstrukt eingestellt wurden.

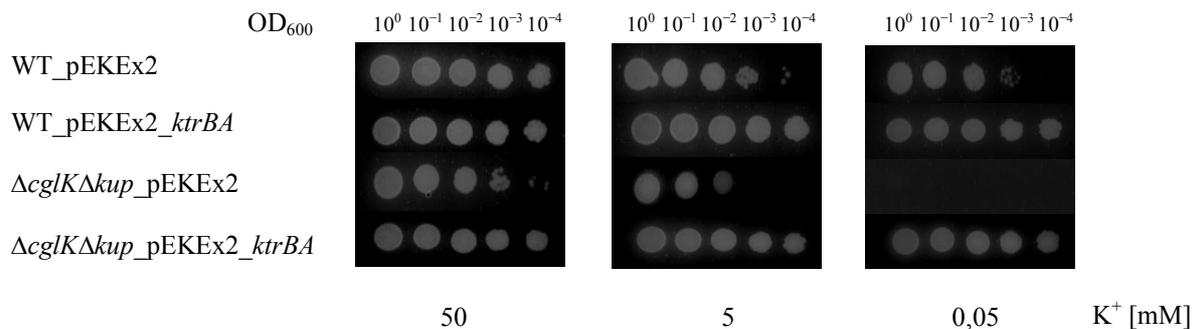
Um die Funktionalität des heterologen KtrAB-Kaliumtransportsystems aus *C. jeikeium* in den *C. glutamicum* Stämmen WT und  $\Delta cglK\Delta kup$  zu untersuchen, wurden diese jeweils mit dem pEKEx2\_*ktrBA*-Konstrukt oder dem leeren pEKEx2-Plasmid transformiert, und das Wachstum der rekombinanten Zellen auf Minimalmedium-Agarplatten mit unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen bei einem für *C. glutamicum* ( $pH_{intern}=7,5$ ) leicht saurem externen pH-Wert von 7,0 untersucht (Abb. 3.34).



**Abb. 3.33: Genomische Kartierung der *ktrBA*-Gene aus *C. jeikeium* und heterologe Expression in *C. glutamicum*.** Das 2000 bp große *ktrBA*-Operon aus *C. jeikeium* wurde mit den Primern „Pre300\_Ue\_Ktr\_Cjeik\_5“ und „Ue\_Ktr\_CStrep\_Cjeik\_3“ mit 300 bp vor dem 5'-Startcodon und einer Strep-Tag-Sequenz am 3'Ende amplifiziert und in den Vektor pEKEx2 kloniert (A). Die Kontrolle der Transformation der *C. glutamicum*-Zellen mit den Plasmiden pEKEx2 oder pEKEx2\_*ktrBA* erfolgte mittels PCR mit den Primern „pEKEx2\_forward“ und „pEKEx2\_reverse“ (B). War das plasmidcodierte Gencluster *ktrBA* vorhanden, so war das PCR-Fragment 2400 bp groß, war hingegen der leere pEKEx2-Vektor vorhanden, so entstand ein 200 bp großes PCR-Produkt. Die Kontrolle der Expression erfolgte, indem jeweils 100 µg Proteinextrakt der rekombinanten Zellen, die in Anwesenheit von 0,5 mM IPTG kultiviert worden waren, in einer 14%igen SDS-PAGE aufgetrennt und ein Western Blot Nachweis mit Anti-Strep-Antikörpern durchgeführt wurde (C). Auf der Höhe von 27 kDa ist das Signal der KtrA-Proteinbande durch einen Pfeil markiert.

In der Anwesenheit von 50 mM Kalium wuchsen die Zellen aller rekombinanten Stämme nahezu gleich gut. Bei einer Kaliumkonzentration von 5 mM waren die  $\Delta cglK\Delta kup$ -Zellen mit dem leeren pEKEx2-Plasmid nur eingeschränkt wachstumsfähig, während der WT nur etwas schwächer als in Anwesenheit von 50 mM KCl wuchs. Mit dem pEKEx2\_*ktrBA*-Vektor war hingegen weder das Wachstum des WTs, noch der  $\Delta cglK\Delta kup$ -Mutante im Vergleich zu den Bedingungen mit 50 mM KCl verringert. Bei der geringsten, in den Agarplatten einstellbaren Kaliumkonzentration, von 0,05 mM wuchs der WT mit dem heterologen KtrAB-System wesentlich besser als die Kontrolle mit dem leeren pEKEx2-Plasmid. Während die  $\Delta cglK\Delta kup$ -Zellen mit pEKEx2 bei 0,05 mM KCl nicht wuchsen, konnte der Stamm mit dem heterologen KtrAB-System genauso so gut, wie der WT mit KtrAB wachsen.

Somit konnte durch die heterologe, funktionelle Expression des Genclusters *ktrBA* aus *C. jeikeium* in *C. glutamicum* der kalium-sensitive Wachstumsphänotyp der  $\Delta cglK\Delta kup$ -Mutante vollständig komplementiert, und desweiteren ein positiver Effekt auf das Wachstum der WT-Zellen bei geringen externen Kaliumkonzentrationen unter leicht sauren Bedingungen verzeichnet werden.



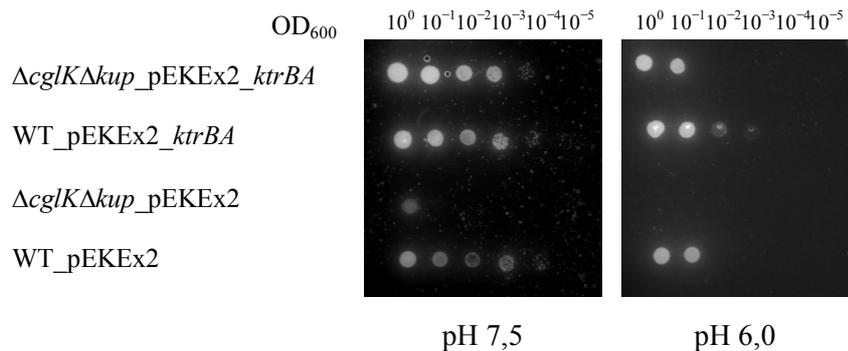
**Abb. 3.34: Einfluss des heterologen KtrAB-Systems auf das Wachstum von *C. glutamicum* WT und  $\Delta cglK\Delta kup$ .** *C. glutamicum*-Zellen der Stämme WT\_pEKEEx2,  $\Delta cglK\Delta kup$ \_pEKEEx2, WT\_pEKEEx2\_ *ktrBA* und  $\Delta cglK\Delta kup$ \_pEKEEx2\_ *ktrBA* wurden kaliumentleert, und ihr Wachstum auf Minimalmedium-Agarplatten (pH 7,0) mit 50, 5 und 0,05 mM KCl untersucht. Eine Zelldichte von  $OD_{600}=1$  und folgende Verdünnungen wurden jeweils in kaliumfreien Minimalmedium erstellt, und jeweils 4  $\mu$ l auf die Platten getropft. Die Inkubation erfolgte für 42 h bei 30°C

### 3.7.2 Einfluss des heterologen KtrAB-Transporters auf die pH-Homöostase von *C. glutamicum*

Der Kanal CgIK ist in *C. glutamicum* bei saurem pH-Stress das Hauptaufnahmesystem für Kalium. Die Möglichkeit zur internen Kaliumakkumulation ist dabei vom elektrochemischen Kaliumpotential abhängig. Kalium kann nur von den Zellen aufgenommen werden, wenn eine ausreichend hohe externe Kaliumkonzentration und ein ausreichendes Membranpotential vorliegen.

Zur Untersuchung des Einflusses des KtrAB-Systems auf die pH-Homöostase und das Wachstum von *C. glutamicum*, wurden Tropfteste mit kaliumgehungerten Zellen auf Agarplatten mit 5 mM KCl bei pH 7,5 und pH 6,0 durchgeführt. Während bei pH 7,5 in der Anwesenheit von 5 mM KCl die WT-Zellen mit dem pEKEEx2-Plasmid im gleichen Ausmaß wie die Zellen mit dem Vektor pEKEEx2\_ *ktrBA* wuchsen, war das Wachstum der  $\Delta cglK\Delta kup$ -Mutante mit pEKEEx2 im Vergleich zu den  $\Delta cglK\Delta kup$ -Zellen mit dem KtrAB-System stark eingeschränkt (Abb. 3.35). Bei pH 6,0 wuchsen die WT-Zellen mit pEKEEx2 eingeschränkt,

wohingegen sich die Zellen mit pEKEEx2\_ *ktrBA* durch besseres Wachstum auszeichneten.  $\Delta$ *cglK* $\Delta$ *kup*-Zellen mit Plasmid pEKEEx2 wuchsen nicht auf den Platten mit pH 6,0 und 5 mM KCl. Mit dem Expressionsplasmid pEKEEx2\_ *ktrBA* konnten die  $\Delta$ *cglK* $\Delta$ *kup*-Zellen hingegen genauso gut wie die WT-Zellen mit pEKEEx2 wachsen.

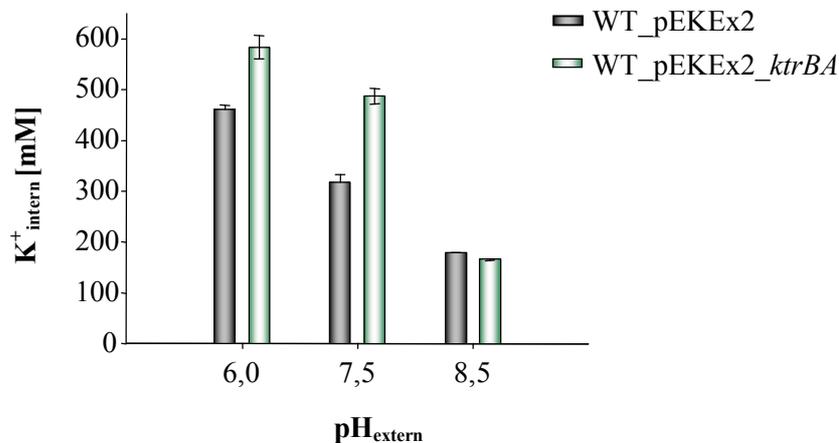


**Abb. 3.35: Einfluss der *ktrBA*-Expression auf das Wachstum von *C. glutamicum* unter kaliumlimitierenden Säurestressbedingungen.** *C. glutamicum*-Zellen der Stämme WT\_pEKEEx2,  $\Delta$ *cglK* $\Delta$ *kup*\_pEKEEx2, WT\_pEKEEx2\_ *ktrBA* und  $\Delta$ *cglK* $\Delta$ *kup*\_pEKEEx2\_ *ktrBA* wurden kaliumentleert, und ihr Wachstum auf Minimalmedium-Agarplatten mit 5 mM KCl untersucht. Eine Zelldichte von OD<sub>600</sub>=1 und folgende Verdünnungen wurden jeweils in kaliumfreien Minimalmedium erstellt, und jeweils 4  $\mu$ l auf die Platten getropft. Die Inkubation erfolgte für 42 h bei 30°C.

Um zu untersuchen, welche Auswirkungen der heterologe KtrAB-Transporter auf die interne Akkumulation von Kalium in *C. glutamicum* bei pH-Stress hat, wurde der interne Kaliumgehalt von Zellen des WT mit und ohne *ktrBA*-Expressionsplasmid nach achtstündiger Kultivierung in Anwesenheit von 1 mM KCl und 0,5 mM IPTG bei unterschiedlichen pH-Werten flammenphotometrisch bestimmt (Abb. 3.36).

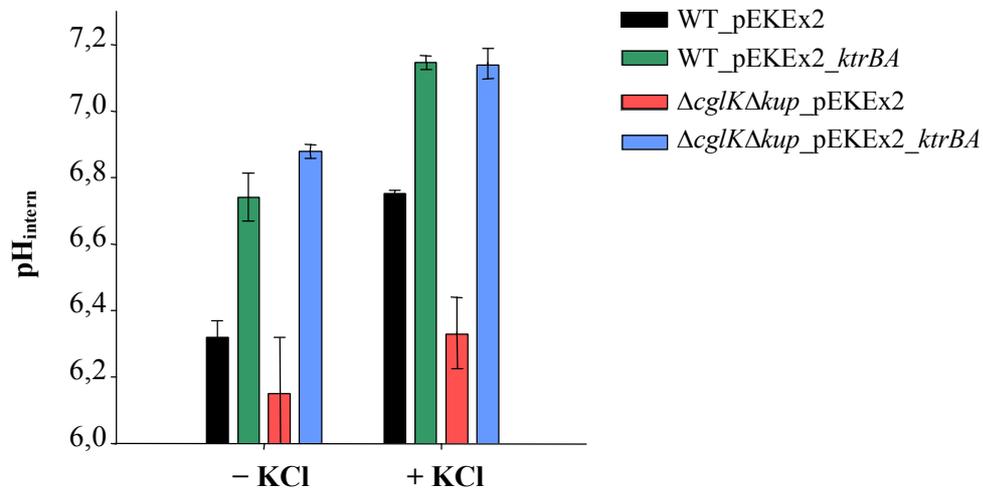
Sowohl unter neutralen, als auch unter sauren pH-Bedingungen, wurde ein höherer interner Kaliumgehalt in den *C. glutamicum*-Zellen mit dem KtrAB-System im Vergleich zu Zellen mit dem Kontrollplasmid pEKEEx2 gemessen. Bei pH 7,5 war der interne Kaliumgehalt der WT-Zellen mit dem pEKEEx2\_ *ktrBA*-Plasmid um rund 170 mM größer als in den Zellen mit dem leeren pEKEEx2-Plasmid. Bei pH 6,0 hatten die Zellen mit dem KtrAB-System *circa* 120 mM mehr Kalium intern akkumuliert. Im Vergleich dazu, unterschied sich der interne Kaliumgehalt der Zellen mit dem KtrAB-Transporter bei pH 8,5 nicht von dem der WT-Zellen, die nur über den CgIK-Kanal verfügen.

Somit sind *C. glutamicum*-Zellen durch den heterologen, aktiven KtrAB-Transporter aus *C. jeikeium* bei neutralen und tiefen pH-Werten in der Lage mehr Kalium im Cytoplasma zu akkumulieren.



**Abb. 3.36: Einfluss der *ktrBA*-Expression auf die Kaliumakkumulation von *C. glutamicum*.** Zellen der Stämme WT\_pEKEEx2 und WT\_pEKEEx2\_ktrBA wurden kaliumentleert und in Minimalmedium bei pH 8,5, 7,5 und 6,0 in der Anwesenheit von 1 mM KCl und 0,5 mM IPTG acht Stunden lang kultiviert. Der interne Kaliumgehalt der Zellen wurde daraufhin flammenphotometrisch bestimmt (n=3).

Zur Untersuchung des direkten Einflusses des KtrAB-abhängigen Kaliumtransportes auf die pH-Homöostase von *C. glutamicum* wurde der interne pH-Wert von kaliumgehungerten Zellen des WTs und der  $\Delta cglK\Delta kup$ -Mutante mit dem Kontrollplasmid pEKEEx2 bzw. dem Expressionsplasmid pEKEEx2\_ktrBA 15 min nach einem externen pH-Shift von 7,5 zu pH 6,0 in Abhängigkeit von Kalium gemessen. In WT-Zellen mit pEKEEx2 lag in der Anwesenheit von 50 mM Kalium bei einem externen pH von 6,0 der interne pH-Wert bei rund 6,7 (Abb. 3.37). Mit dem Expressionsplasmid pEKEEx2\_ktrBA war unter den gleichen Bedingungen der interne pH-Wert des WTs um 0,3 Einheiten höher. Auch bei der geringsten Kaliumkonzentration von 0,05 mM hatten die WT-Zellen mit KtrAB einen um 0,6 Einheiten höheren internen pH-Wert, als die WT-Zellen mit dem leeren pEKEEx2-Plasmid. Während in den *C. glutamicum*-Zellen ohne *cglK* und *kup* mit pEKEEx2 unabhängig von der Kaliumkonzentration der interne pH-Wert bei 6,2 lag, war er in den  $\Delta cglK\Delta kup$ -Zellen mit pEKEEx2\_ktrBA bei der niedrigsten Kaliumkonzentration um 0,6 und in Anwesenheit von 50 mM Kalium um 0,9 pH-Einheiten gesteigert. Somit kann durch den KtrAB-Transporter der kaliumabhängige pH-sensitive Wachstumsphänotyp der  $\Delta cglK\Delta kup$ -Mutante vollständig komplementiert werden. Zusätzlich zu der kanalvermittelten Kaliumaufnahme durch CgIK ermöglicht die Anwesenheit des KtrAB-Transporters den *C. glutamicum*-Zellen bei Säurestress einen höheren internen pH-Wert aufrecht zu erhalten, und verbessert dadurch ihre Stressresistenz.

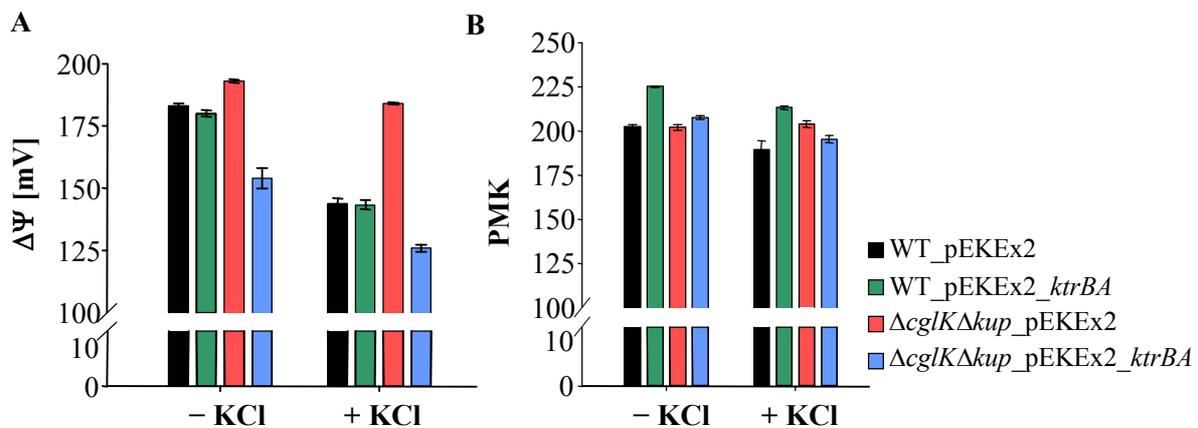


**Abb. 3.37: Einfluss der Expression von *ktrBA* auf den internen pH der *C. glutamicum*-Zellen WT und  $\Delta cglK\Delta kup$ .** Zellen des WT und der  $\Delta cglK\Delta kup$ -Mutante mit dem Kontrollplasmid pEKEEx2, bzw. dem Expressionsplasmid pEKEEx2\_ *ktrBA* wurden kaliumleert einem pH-Shift von 7,5 auf 6,0 in Anwesenheit von 0,05 mM KCl (-) oder 50 mM KCl (+) ausgesetzt, und ihr interner pH-Wert nach 15 min bestimmt (n=3).

Um zusätzlich die Auswirkungen des KtrAB-vermittelten Kaliumtransportes auf die Bioenergetik von *C. glutamicum* zu untersuchen, wurden die Komponenten, die zur Aufrechterhaltung der bioenergetischen Zellfunktion beitragen, analysiert. Dazu gehörten das Membranpotential ( $\Delta\Psi$ ), welches zusammen mit dem pH-Gradienten ( $\Delta pH$ ) über der Membran den Wert der Protonenmotorischen Kraft (PMK) bestimmt (Gleichung 12) und die Atmungsaktivität der Zellen. Im Rahmen der pH-Homöostase von *C. glutamicum* ist eine kaliumabhängige, CglK-vermittelte Verringerung des Membranpotentials bei niedrigen externen pH-Werten notwendig (Follmann *et al.*, 2009a). Die Zellen der unterschiedlichen Stämme wurden kaliumgehungert, und der externe pH-Wert in Anwesenheit von 0,05 bzw. 50 mM KCl von pH 7,5 auf pH 6,0 herabgesetzt. In den Zellen des WT mit dem pEKEEx2-Plasmid wurde nach 15 min in Anwesenheit von 0,05 mM Kalium ein hohes Membranpotential von rund 180 mV und mit 50 mM Kalium ein niedrigeres Membranpotential von ungefähr 140 mV gemessen (Abb. 3.38A). Unabhängig von der Kaliumkonzentration betrug der Wert des Membranpotentials in der  $\Delta cglK\Delta kup$ -Mutante mit pEKEEx2 *circa* 190 mV. War hingegen das KtrAB-System vorhanden, so war in den  $\Delta cglK\Delta kup$ -Zellen das Membranpotential um rund 30 mV reduziert.

Somit war sowohl im WT unabhängig von der Anwesenheit von *ktrBA*-, als auch im rekombinanten Stamm  $\Delta cglK\Delta kup$ \_pEKEEx2\_ *ktrBA* in der Anwesenheit von Kalium bei tiefem externen pH-Wert der Wert des Membranpotentials niedrig. Dabei wurden für alle Stämme untereinander vergleichbare Werte für die Protonenmotorische Kraft (PMK) von

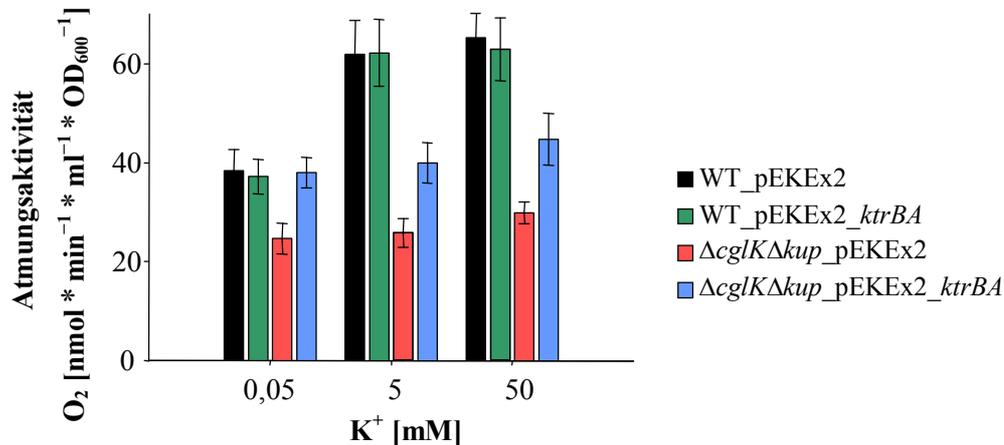
rund 200 mV, unabhängig von der Anwesenheit des Kaliumkanals oder des KtrAB-Transporter, ermittelt (Abb. 3.38B).



**Abb. 3.38: Einfluss der *ktrBA* Expression auf bioenergetische Parameter von *C. glutamicum*-Zellen des WTs und der  $\Delta cglK\Delta kup$ -Mutante.** Die kaliumgehungerten Zellen wurden einem pH-Shift von pH 7,5 auf pH 6,0 in Anwesenheit von 0,05 (-) oder 50 mM KCl (+) ausgesetzt, ihr Membranpotential  $\Delta\Psi$  (A) nach 15 min gemessen, und die Protonenmotorische Kraft (PMK) mit den Daten der internen pH-Werte (vgl. Abb. 3.36) berechnet (B). Alle Werte wurden als Potentiale in mV angegeben (n=3).

Beim WT gab es kaliumunabhängig keine Unterschiede bei der Atmungsaktivität zwischen den Zellen mit oder ohne KtrAB. Ohne Kaliumzusatz betrug der Sauerstoffverbrauch ungefähr  $38 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} * \text{ml}^{-1} * \text{OD}_{600}^{-1}$ , während dieser durch die Zugabe von Kalium auf rund  $62 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} * \text{ml}^{-1} * \text{OD}_{600}^{-1}$  gesteigert wurde (Abb. 3.39). Die  $\Delta cglK\Delta kup$ -Zellen mit dem Kontrollplasmid pEKEx2 zeigten nach einem pH-Shift von 7,5 zu 6,0 kaliumunabhängig eine Atmungsaktivität bezüglich des Sauerstoffverbrauches von ungefähr  $27 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} * \text{ml}^{-1} * \text{OD}_{600}^{-1}$ . In Zellen des  $\Delta cglK\Delta kup$ -Stammes mit pEKEx2\_*ktrBA* wurde die Atmungsaktivität nach der Zugabe von 5 oder 50 mM Kalium von 27 auf  $40 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} * \text{ml}^{-1} * \text{OD}_{600}^{-1}$  erhöht.

Somit hatte die Anwesenheit des KtrAB-Transporters direkt nach einem pH-Shift keinen Einfluss auf die Atmungsaktivität von *C. glutamicum*, wenn der CglK-Kanal vorhanden war. Ohne den Kaliumkanal wurde die Atmungsaktivität der Zellen mit dem KtrAB-System nach Herabsetzung des pH-Wertes zwar signifikant erhöht, erreichte aber im untersuchten Zeitraum nicht den Wert der Zellen mit funktionellem CglK-Kanal.

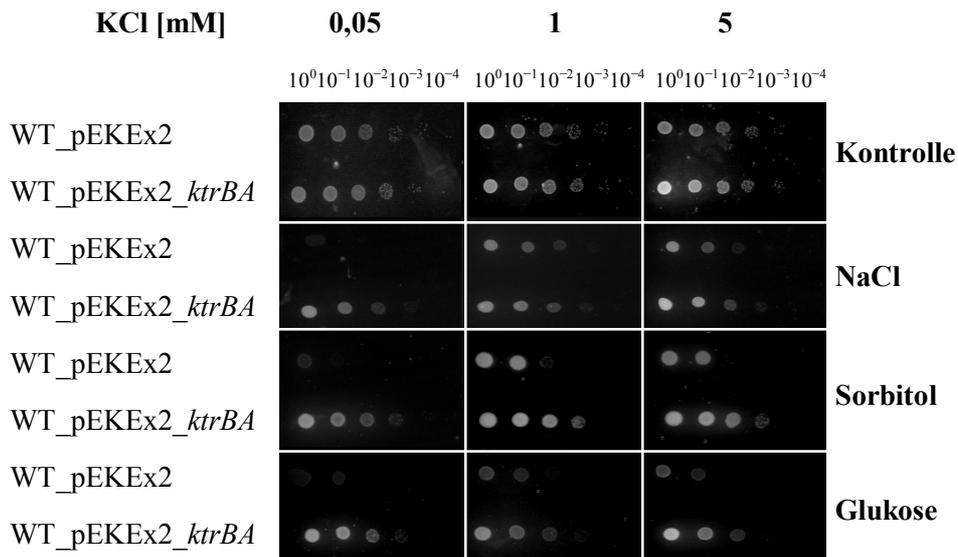


**Abb. 3.39: Einfluss der *ktrBA*-Expression auf die Atmungsaktivität von *C. glutamicum*.** Zellen des WT und der  $\Delta cglK\Delta kup$ -Mutante mit dem Plasmid pEKEEx2. bzw. pEKEEx2\_ *ktrBA* wurden kaliumgehungert und einem pH-Shift von 7,5 auf pH 6,0 in Minimalmedium mit 0, 5 oder 50 mM KCl ausgesetzt. Die jeweilige Atmungsaktivität der Zellen wurde direkt nach dem pH-Shift über den Sauerstoffverbrauch ermittelt (n=3).

### 3.7.3 Einfluss des heterologen KtrAB-Transporters auf die Osmostressantwort von *C. glutamicum*

Eine weitere Möglichkeit um den Effekt des aktiven Kaliumtransportsystems KtrAB aus *C. jeikeium* auf *C. glutamicum* zu untersuchen, waren limitierende hyperosmotischen Bedingungen. Dazu wurden Tropfteste mit Zellen der Stämme WT\_pEKEEx2 und WT\_pEKEEx2\_ *ktrBA* auf IPTG-haltigen Minimalmedium-Agarplatten mit unterschiedlichen ionischen und nicht-ionischen Substanzen sowie verschiedenen Kaliumkonzentrationen durchgeführt. Unter Kontrollbedingungen wuchsen beide Stämme auch bei der geringsten Kaliumkonzentration von 0,05 mM gleich gut (Abb. 3.40). Mit zusätzlichen 0,75 M NaCl (1390 mosmol/kg) in der Agarplatte konnten die WT\_pEKEEx2-Zellen jedoch bei der geringsten Kaliumkonzentration nicht mehr wachsen. Das Wachstum der WT-Zellen pEKEEx2\_ *ktrBA* war bei dem ionischen Salzstress hingegen vom Kaliumgehalt unbeeinflusst. In der Anwesenheit von 1,158 M Sorbitol, was der Osmolalität von 0,75 M NaCl entspricht, war das Wachstum der WT-Zellen mit dem Kontrollplasmid pEKEEx2 in der Anwesenheit von 1 sowie 5 mM KCl stärker eingeschränkt, als das der WT-Zellen mit KtrAB. Bei der niedrigsten Kaliumkonzentration wuchsen auf den sorbitolhaltigen Platten nur die WT-Zellen mit KtrAB. Wurden den Minimalmedium-Agarplatten zusätzlich 10% Glukose mit einer osmotischen Wirksamkeit von 579 mosmol/kg zugesetzt, war das Wachstum des Stammes WT\_pEKEEx2 schon in der Anwesenheit von 5 mM KCl, im Vergleich zu den Kontrollbedingungen, massiv eingeschränkt und bei 0,05 mM KCl nicht mehr detektierbar. Die WT-Zellen mit pEKEEx2\_ *ktrBA* wuchsen hingegen unter diesen Bedingungen im

Vergleich zu ihrem Wachstum auf Agarplatten ohne Osmolytzusatz, kaliumunabhängig nur geringfügig schlechter. Somit hatte das KtrAB-Transportsystem unter hyperosmotischen Bedingungen, die durch ionische oder nicht-ionische Substanzen bedingt waren, einen positiven Einfluss auf das Wachstum von *C. glutamicum*, besonders wenn eine zusätzliche Kaliumlimitation bestand.



**Abb. 3.40: Einfluss der *ktrBA*-Expression auf das Wachstum von *C. glutamicum* unter ionischen und nicht-ionischen hyperosmotischen Stressbedingungen.** *C. glutamicum*-Zellen der Stämme WT\_pEKEEx2 und WT\_pEKEEx2\_ *ktrBA* wurden kaliumgehungert und ihr Wachstum auf Minimalmedium-Agarplatten ohne Zusatz (300 mosmol/kg) mit 0,75 M NaCl (+1390 mosmol/kg), 1,158 M Sorbitol (+1390 mosmol/kg) oder zusätzlich 10% Glukose (+579 mosmol/kg) in der Anwesenheit von 5, 1 oder 0,05 mM KCl untersucht. Eine Zelldichte von OD<sub>600</sub>=1 und folgende Verdünnungen wurden jeweils in kaliumfreien Minimalmedium erstellt, und jeweils 3,5 µl auf die Platten getropft. Die Inkubation erfolgte für 42 h bei 30°C.

Desweiteren wurde der Einfluss des KtrAB-Systems auf die Kaliumakkumulation der *C. glutamicum*-Zellen unter hyperosmotischen Bedingungen untersucht, indem WT-Zellen mit pEKEEx2 oder pEKEEx2\_ *ktrBA* in Schüttelkolben sechs Stunden lang in Minimalmedium mit 1 mM KCl und zusätzlichen 0,75 M NaCl oder 10% Glukose kultiviert, und ihr Wachstum dokumentiert, sowie ihr interner Kaliumgehalt bestimmt wurde.

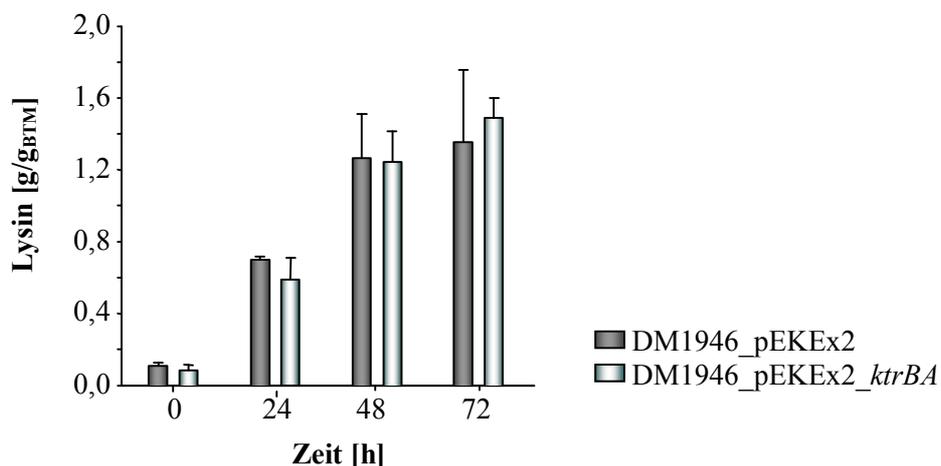
Die Wachstumsrate der WT-Zellen mit pEKEEx2 unterschied sich in der Anwesenheit von 0,75 M NaCl nicht signifikant von der der WT-Zellen mit pEKEEx2\_ *ktrBA* und lag bei ungefähr 0,16 h<sup>-1</sup>. Hingegen war der interne Kaliumgehalt der WT-pEKEEx2\_ *ktrBA*-Zellen nach der sechsständigen Kultivierung bei Salzstress mit 600 ± 24 mM signifikant höher als der der WT-Zellen mit pEKEEx2, dessen interne Kaliumkonzentration nur 494 ± 19 mM betrug. Mit zusätzlich 10% Glukose im Medium wuchsen beide Stämme mit einer Rate von ungefähr 0,18 h<sup>-1</sup> ebenfalls gleich gut. Die Zellen des Stammes WT\_pEKEEx2\_ *ktrBA* hatten jedoch mit einer internen Kaliumkonzentration von 470 ± 38 mM mehr Kalium als die

WT\_pEKEEx2-Zellen akkumuliert, deren interner Kaliumgehalt  $405 \pm 15$  mM betrug. Somit konnten *C. glutamicum*-Zellen mit dem heterologen KtrAB-Transporter aus *C. jeikeium* unter hyperosmotischen Bedingungen in Flüssigkultur, im Vergleich zur Langzeitanpassung auf Agarplatten, nur geringfügig besser wachsen, jedoch im gleichen Zeitrahmen mehr Kalium akkumulieren.

### 3.7.4 Auswirkungen von KtrBA auf die Lysinproduktion durch *C. glutamicum*

Um zu untersuchen, ob der CgIK-Kanal als alleiniges Kaliumaufnahmeystem in *C. glutamicum* unter Stressbedingungen, die während Produktionsprozessen in Fermentern auftreten können, für die Aminosäureproduktion ausreichend ist, wurde die Lysinproduktion des Produktionsstammes DM1946\_pEKEEx2 mit der von DM1946\_pEKEEx2\_ktrBA verglichen. Dazu wurden beide Stämme jeweils in gepuffertem Minimalmedium bei pH 7,5 in der Anwesenheit von 1 mM KCl und zusätzlich 10% Glukose drei Tage lang kultiviert, und die externen Lysingehalte im Medium, sowie die daraus resultierenden Ausbeuten bezogen auf die Biotrockenmasse (BTM) bestimmt.

Die Lysinausbeuten, die bei der Kultivierung der beiden Stämme erreicht wurden, unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Abb. 3.41). Nach einem Tag wurden rund 0,65 g, nach zwei Tagen etwa 1,24 g und am dritten Tag *circa* 1,4 g Lysin, jeweils auf die Biotrockenmasse bezogen, produziert und ins Medium exkretiert. Die CgIK-vermittelte Kaliumaufnahme war somit ausreichend für die Lysinproduktion von *C. glutamicum*, während die zusätzliche KtrAB-Transporter-vermittelte Kaliumaufnahme keinen Effekt auf die Höhe der Ausbeuten hatte.



**Abb. 3.41: Lysinbildung der Stämme DM1946\_pEKEEx2 und DM1946\_pEKEEx2\_ktrBA.** Die Zellen beider Stämme wurden in Minimalmedium bei pH 7,5 in der Anwesenheit von 1 mM KCl und zusätzlich 10% Glukose kultiviert. Zu Beginn (0 h), nach 24, 48 und 72 h wurden jeweils die OD<sub>600</sub> der Kultur bestimmt und in Überstandsproben mittels HPLC die Lysinkonzentration bestimmt. Die Lysinausbeuten wurden als g pro Biotrockenmasse g<sub>BTM</sub> berechnet (n=3).

---

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Sensitivität von *C. glutamicum* gegenüber tiefen pH-Werten wird durch die Akkumulation von Cystein beeinflusst

Die Identifikation und das Verständnis metabolischer Limitationen bei tiefen pH-Werten sollten die pH-Stressantwort von *C. glutamicum* näher charakterisieren. Bezüglich der Methioninbiosynthese kommt es bei tiefen externen pH-Werten in *C. glutamicum*-Zellen zu einem Anstieg des Intermediates S-Adenosylhomocystein (SAH) (Follmann *et al.*, 2009b), welches aus S-Adenosylmethionin (SAM), das bei der Methylierung von DNA verwendet wird (Lu, 2000), entsteht. Diese SAH-Akkumulation führt über die Inaktivierung des Repressors McbR zur Induktion der Gene der Methionin- und Cystein-Biosynthesewege (Rey *et al.*, 2005). Davon ausgenommen ist *aecD*, das für die Cystathionin- $\beta$ -Lyase (AecD) codiert. Bei tiefem pH wird *aecD* nicht vermehrt transkribiert, und auch der Proteingehalt von AecD ist unverändert. Die Aktivität von AecD ist jedoch, aufgrund biochemischer pH-Sensitivität, massiv eingeschränkt. Somit ist das AecD Enzym entscheidend an der Akkumulation der Metabolite Cystathionin und Cystein und einem verminderten Gehalt an Methionin beteiligt (Follmann *et al.*, 2009b).

Während in *E. coli* der wachstumshemmende Effekt der limitierten Methioninbiosynthese unter Säurestressbedingungen durch die externe Methioninzugabe aufgehoben werden kann (Roe *et al.*, 2002), hatte die Zugabe von Methionin bei tiefem pH-Wert auf *C. glutamicum* keinen Effekt, so dass eine Limitation unwahrscheinlich ist. Vielmehr könnte die Akkumulation von Cystein in *C. glutamicum* unter sauren Bedingungen zu einem Ungleichgewicht der Thiolhomöostase führen, welches das Wachstum der Zellen einschränkt. Cystein steht im Gleichgewicht mit seinem Redoxpartner Cystin, welches vom Enzym AecD gegenüber Cystathionin bevorzugt wird. Bei einer Cysteinakkumulation könnten aufgrund dieser Präferenz von AecD für Cystin, die Methionin- und SAM-Biosynthesen zusätzlich inhibiert sein, was zur weiteren Anhäufung von Cystein führen würde. Diese erhöhten Cysteinkonzentrationen könnten unter anderem zur Entstehung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Hydroxylradikalen über die Fentonreaktion beitragen, und somit wie in *E. coli* toxisch wirken (Park und Imlay, 2003).

#### 4.2 Bei tiefen pH-Werten kommt es durch die endogene Entstehung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu oxidativem Stress

Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen, die in den Medien der bei pH 6,0 und pH 7,5 kultivierten *C. glutamicum*-Zellen gemessen wurden, sind ein Hinweis darauf, dass in Abhängigkeit vom externen pH-Wert die Zellen oxidativem Stress ausgesetzt sind. Die maximalen Konzentrationen von externem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, die für *E. coli* beschrieben sind, liegen zwischen 0,5-1 µM (Varghese *et al.*, 2007). In *E. coli*-Kulturen konnte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nur nachgewiesen werden, wenn in den Zellen das Gen für die Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase (AhpCF), ein H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vernichtendes Enzym, ausgeschaltet war (Seaver und Imlay, 2001). In *C. glutamicum* gibt es kein zum Ahp-Enzym aus *E. coli* homologes System. Der Katalasegehalt ist in *C. glutamicum*-Zellen, die bei pH 6,0 und pH 7,5 kultiviert werden, allerdings wesentlich geringer als bei pH 9,0 (Follmann *et al.*, 2009b). Der zelluläre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Schutzmechanismus könnte somit in den Zellen unter niedrigen und neutralen Bedingungen limitiert sein. Die externe Zugabe aufgereinigter Katalase bei neutralen pH hatte zwar einen leicht wachstumsfördernden Effekt, bei tiefem pH könnten hingegen neben der möglichen unzureichenden oxidativen Stressabwehr zusätzliche limitierende Faktoren einen positiven Effekt der externen Katalasezugabe auf das Wachstum verhindert haben.

Der vom pH-Wert abhängige Wachstumsphänotyp der Katalase-defizienten *C. glutamicum*-Mutante, der durch eingeschränktes Wachstum unter alkalischen Bedingungen gekennzeichnet war, steht möglicherweise im Zusammenhang mit einer induzierten Abwehr von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unter diesen Bedingungen. Die endogene Entstehung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> könnte unter alkalischen Bedingungen höher als bei neutralen oder tiefen pH-Werten sein, der der induzierte enzymatische Abbau entgegenwirkt. Quellen für die Entstehung von Wasserstoffperoxid könnten neben der Atmungskette alternative Oxidasen wie die Lactat- oder die Pyruvat-Oxidase sein, die z. B. in Milchsäurebakterien für die Produktion großer Mengen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verantwortlich sind (Seaver und Imlay, 2004; Imlay 2008). In *C. glutamicum* sind sowohl die Lactat-Oxidase, als auch die Pyruvat-Oxidase bei tiefen pH-Werten induziert (Follmann *et al.*, 2009b). Ein Abfall des internen pH-Wertes in *C. glutamicum*-Zellen unter sauren Bedingungen könnte ebenfalls zur vermehrten Bildung weiterer reaktiver Sauerstoffspezies durch lösliche Oxidoreduktasen, die an den Cofaktor FADH<sub>2</sub> und einen engen pH-Optimumsbereich gebunden sind, führen (Woodmansee und Imlay, 2002; Imlay, 2003).

Die bisherigen identifizierten Auswirkungen von Säurestress auf den Stoffwechsel von *C. glutamicum* stellen nur beispielhafte Punkte dar, an denen die Zelle im Rahmen der pH-

Homöostase regulierenden Einfluss haben muss. Zur Identifikation weiterer Limitationen in *C. glutamicum*, die das Wachstum unter tiefen pH-Bedingungen einschränken, könnten Untersuchungen der Systeme dienen, die möglicherweise an der sekundären, endogenen Entstehung von oxidativem Stress in *C. glutamicum* beteiligt sind. Um diese Systeme auffindig zu machen, könnten vergleichende Transkriptom- und Proteomanalysen von Zellen des WT und der Katalase-defizienten Mutante durchgeführt werden. Desweiteren könnten in Proteincarboxylierungsstudien durch oxidativen Stress geschädigte Proteine in *C. glutamicum*-Zellen identifiziert werden. Zudem könnten Proteine, die möglicherweise an der Abwehr von oxidativem Stress in *C. glutamicum* beteiligt sind, wie Protein der DNA-Reparatur und *de novo*-Synthese näher charakterisiert werden. Auch könnten Metalle, wie Eisen oder Mangan direkt oder indirekt an der oxidativen Stressantwort der Zelle beteiligt sein (Park und Imlay, 2003; Mc Ewan, 2009), so dass durch die Untersuchung der Mangan- und Eisenaufnahmesystem in *C. glutamicum* ebenfalls neue Ansatzpunkte gewonnen werden könnten.

### **4.3 Unter Säurestressbedingungen ist die kaliumabhängige Stimulation der Atmungskettenaktivität für die Bioenergetik von *C. glutamicum* wichtig**

Zur effektiven pH-Homöostase sind nur Zellen mit einem uneingeschränkten Energiestoffwechsel fähig. Die Protonenmotorischen Kraft (PMK) und die Atmungskettenaktivität sind für die ATP-Synthese über die  $F_1F_0$ -ATPase essentiell. Die PMK der *C. glutamicum*-Zellen wird kaliumunabhängig über einen weiten pH-Bereich konstant gehalten, indem der Wert des Membranpotentials pH-Wert-abhängig reguliert wird (Follmann *et al.*, 2009b). Sinkt der externe pH-Wert ab, steigt der Wert des pH-Gradienten über der Membran an und geht mit einem Kaliumstrom einher, der den Wert des Membranpotentials aufgrund der Ladungsverschiebung vermindert (Follmann *et al.*, 2009a). Die Aufnahme von Kalium durch CgIK reduziert bei tiefen externen pH-Werten den Wert des Membranpotentials und ermöglicht es den *C. glutamicum*-Zellen ihren internen pH-Wert über einen vermehrten Protonenexport zu steigern (Follmann *et al.*, 2009a). Die Menge des intern akkumulierten Kaliums ist jedoch viel größer, als sie für die alleinige Veränderung des Membranpotentials notwendig wäre. Die Aktivität der Atmungskette, die Veränderungen des Membranpotentials und des internen pH-Wertes detektieren kann (Kim, 2002), war in Abwesenheit von Kalium nach Erniedrigung des externen pH-Wertes massiv eingeschränkt, und wurde erst nach einem Kaliumstrom stimuliert. Ohne den CgIK-Kanal blieb dieser Effekt aus, da die Kaliumionen nicht die Zellmembran passieren konnten. Erst durch die

Zugabe von Valinomycin, das als kaliumselektives Ionophor die Membran spezifisch für Kaliumionen durchlässig machte und das Membranpotential absenkte, wurde auch in diesen Zellen die Atmungsaktivität im gleichen Maße wie im WT erhöht.

Somit ist nicht das CgIK-Protein an sich, sondern der darüber vermittelte Kaliumeinstrom mit der einhergehenden Absenkung des Membranpotentials für den stimulierenden Effekt auf die Atmungskette verantwortlich. Ob die Atmungskette jedoch durch die Absenkung des Membranpotentials, oder durch die Kaliumionen stimuliert wurde, konnte nicht geklärt werden. Darüber würden zeitlich hochaufgelöste, parallele *online* Messungen des Membranpotentials, des Kaliumflusses und des internen pH-Werts mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen Aufschluss geben. Dabei könnte durch die Zugabe eines Entkopplers das Membranpotential künstlich abgebaut werden, und der Effekt mit dem des Kaliumeinstroms verglichen werden.

Durch die stimulierte Atmungskettenaktivität werden vermehrt Protonen über die membranintegrierten Atmungskettenkomplexe aus dem Cytoplasma exportiert, was die Aufrechterhaltung des internen pH-Wertes unterstützt. Der für die Aufrechterhaltung des internen pH-Wertes notwendige Protonenexport ist jedoch viel größer, als er durch die Atmungskette vermittelt werden kann. Zur Unterscheidung des Betrags der einzelnen Atmungskettenkomplexe zum Membranpotential oder zum pH-Gradienten über der Membran, könnte in *C. glutamicum*-Mutanten mit deletierten Teilen der Atmungskette der interne pH-Wert und das Membranpotential nach einem pH-Shift bestimmt werden. Auf der Suche nach weiteren möglichen protonenexportierenden Systemen kann der putative Kup-Transporter von *C. glutamicum* mit einer Funktion als Protonen-Kalium-Antiporter ausgeschlossen werden, da die Deletionsmutante bei pH-Stress keinen Phänotyp aufweist und keine Beteiligung von Kup am Kaliumtransport gemessen wurde (Follmann *et al.*, 2009a). In wiefern bisher nicht charakterisierte Transporter in *C. glutamicum* im Rahmen der pH-Homöostase am Protonenexport beteiligt sind, könnte anhand von *knock-out* Mutanten untersucht werden. Hierbei könnte eine ähnliche P-Typ ATPase, wie für *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben (Ambesi *et al.*, 2000), einen Protonenexport vermitteln.

#### **4.4 Bei osmotischem Stress reguliert die CgIK-vermittelte Kaliumakkumulation als indirektes Signal die Akklimation von *C. glutamicum***

Wie schon für andere Bakterien bekannt, benötigte auch *C. glutamicum* Kalium für das Wachstum unter hyperosmotischen Bedingungen, die durch ionische oder nicht-ionische osmotisch aktive Substanzen hervorgerufen wurden. Dafür war im Medium mindestens eine

Kaliumkonzentration von 1 mM notwendig. Die Akkumulation von Kalium in den Zellen von *E. coli* und *B. subtilis* ist als schnelle Antwort auf hyperosmotischen Stress beschrieben, und für deren Überleben unter diesen Bedingungen essentiell (McLaggan *et al.*, 1994; Whatmore und Reed, 1990; Reed *et al.*, 1985). In Übereinstimmung mit den Kaliumflüssen, die in *E. coli*-Zellen gemessen worden sind (Shabala *et al.*, 2009), wurde auch in *C. glutamicum*-Zellen bei steigenden externen Salz- und Sorbitolkonzentrationen vermehrt Kalium im Cytoplasma akkumuliert, wo es essentiell zum Pool der Osmolyte beiträgt. Während in *E. coli* Glutamat das Gegenion zu Kalium darstellt (Dinnbier *et al.*, 1988), konnte dies nicht für *C. glutamicum* bestätigt werden. Ob möglicherweise, wie für Halobakterien beschrieben (Saum und Müller, 2007), gleichzeitig mit den positiven Kaliumionen Chloridionen aufgenommen werden, könnten qualitative und quantitative Analysen der freien Ladungsträger in der *C. glutamicum*-Zelle klären.

Nach einem osmotischen Schock war die Anwesenheit von Kalium in der Zelle für die Induktion der Expression der Gene *betP* und *proP*, die die Aufnahmesysteme BetP und ProP für die kompatiblen Solute Betain und Prolin codieren, essentiell. Für BetP wurde gezeigt, dass es sowohl an der langsamen Langzeitanpassung, als auch an der schnellen, kurzzeitigen Anpassungen an hyperosmotischen Bedingungen beteiligt ist (Weinand *et al.*, 2007). Der gesteigerte Gehalt von BetP-Proteinen in der Membran unter hyperosmotischen Bedingungen (Weinand *et al.*, 2007) bedingt möglicherweise auch den erhöhten Bedarf an Kaliumionen, weil die Aktivierung der BetP-Transportfunktion kaliumabhängig ist, und eine halbmaximale Aktivierung erst in Anwesenheit von 220 mM Kalium erreicht wird (Rübenhagen *et al.*, 2001). Über die Höhe des internen Kaliumgehalts soll durch BetP die Intensität des hyperosmotischen Stresses detektiert, und die BetP-Transportaktivität reguliert werden (Schiller *et al.*, 2004). Dabei ist die Anwesenheit von Kalium für die Aktivität von BetP zwar notwendig, aber nicht hinreichend (Ott, 2008).

Für die geringere und leicht verzögerte Induktion von *proP*, welches das Prolinaufnahmesystem ProP codiert, ist Kalium ebenfalls notwendig. In *E. coli* wird die Aktivität des Prolintransporters ProP durch Kalium stimuliert, das durch die Transportsysteme Kdp und Trk aufgenommen wird (Bremer und Krämer, 2000). Inwiefern das im Cytoplasma von *E. coli* an die RNA-Polymerase gebundene Kalium (Gralla und Vargas, 2006) möglicherweise ebenfalls an die RNA-Polymerase in *C. glutamicum* bindet, und die Transkription von *betP* und *proP* reguliert, könnte in *in vitro* Transkriptionsanalysen untersucht werden. In weiteren Analysen zur Osmostressantwort von *C. glutamicum* könnten Proteine, die im Proteom von *C. glutamicum* unter hyperosmotischen

Bedingungen in erhöhter Peptidanzahl auftreten (Fränzel *et al.*, 2010), bezüglich ihrer Kaliumabhängigkeit getestet werden.

*C. glutamicum*-Zellen ohne *cglK* zeigten unter hyperosmotischen Bedingungen einen kaliumabhängigen Wachstumsphänotyp, wie er auch unter tiefen pH-Werten beobachtet wurde (Follmann *et al.*, 2009a). Für den putativen Kup-ähnlichen Kaliumtransporter in *C. glutamicum* konnte wie unter Säurestressbedingungen (Follmann *et al.*, 2009a) ebenfalls keine Funktion bei erhöhten Salzkonzentrationen beobachtet werden. In *C. glutamicum* ist hingegen das CglK-Protein nicht nur bei tiefem externen pH, sondern auch unter hyperosmotischen Bedingungen das Hauptaufnahmesystem für Kalium, da unabhängig von *kup*, die Anwesenheit der plasmidcodierten *cglK*-Sequenz in einem Expressionsplasmid den salzsensitiven Wachstumsphänotyp der *cglK\_kup*-defizienten Mutante nahezu vollständig komplementierte. Der niedrig-affine Kup-Transporter aus *E. coli* (Bossemeyer *et al.*, 1989) ist unter hyperosmotischen Bedingungen in Kombination mit tiefen pH-Werten als Hauptaufnahmesystem für Kalium identifiziert worden (Trchounian und Kobayahi, 1999). Ein Vergleich des Wachstums der *C. glutamicum*-Stämme WT,  $\Delta cglK\Delta kup$  und  $\Delta cglK$  unter kombinierten Stressbedingungen aus pH- und Osmostress könnte Aufschluss über eine mögliche Funktion von Kup liefern.

#### 4.5 Der CglK-Komplex aus *C. glutamicum* ist ein kaliumspezifischer Kanal

Das membranintegrierte CglK-Protein ist in *C. glutamicum* das Hauptaufnahmesystem für Kalium und im Rahmen der pH-Homöostase an der Einstellung des Membranpotentials beteiligt (Follmann *et al.*, 2009a). Aufgrund der großen Ähnlichkeit zwischen CglK und dem MthK-Kaliumkanal aus *Methanobacterium thermoautotrophicum*, dessen dreidimensionale Struktur gelöst ist (Jiang *et al.*, 2002a), bilden wahrscheinlich vier Volllängenproteine von CglK mit vier zusätzlichen, cytoplasmatisch assemblierten KTN-Proteinen einen Kanalkomplex. Der nach der Solubilisierung detektierte Komplex aus acht CglK-Volllängenproteinen, entstand wahrscheinlich durch die Zusammenlagerung der C-terminalen KTN-Domänen. Für eine mutierte MthK-Kanalvariante ohne RCK-Proteine ist ebenfalls die Bildung eines oktameren Komplexes nachgewiesen worden (Jiang *et al.*, 2002a).

Aufgrund des Verlustes der löslichen KTN-Proteine während der Membranpräparation von CglK könnten die C-terminalen Bereiche nicht mehr durch die separaten KTN-Proteine abgesättigt gewesen sein, und sich daher zusammengelagert haben. Ob in Anwesenheit von KTN-Proteinen, diese ebenfalls gemeinsam mit den CglK-Volllängenproteinen einen oktameren Komplex bilden, könnte durch die Zugabe von einem Überschuss an

aufgereinigten löslichen KTN-Proteinen zu solubilisierten CgIK-Vollängenproteinen und anschließender Gelfiltrationsanalyse oder Auftrennung in einer Blue-Native PAGE untersucht werden. Dies wäre ein Hinweis für einen konstitutiv oktameren CgIK-Komplex, der durch einen zusätzlichen Nachweis eines tetrameren CgIK\_M137Stop-Komplexes unterstützt werden könnte. Hierzu müssten geeignete Bedingungen bei der Solubilisierung von CgIK\_M137Stop getestet werden, die den Komplex stabilisieren, z. B. verschiedene Detergenzien in unterschiedlichen Konzentrationen.

Durch heterologe Expression von *cglK* in *E. coli* konnte der kalium-sensitive Wachstumsphänotyp des Stammes TK2309 komplementiert werden, was die CgIK-vermittelte Kaliumaufnahme zeigte. Bestätigt wurde dies durch den gemessenen Abfall der externen Kaliumkonzentration im Medium und einer internen Akkumulation von Kalium in den TK2309-Zellen mit dem CgIK-Protein im Vergleich zu TK2309 ohne Kaliumaufnahmesysteme. Zusätzlich konnte in *E. coli*-Zellen der Einfluss der CgIK-abhängigen Kaliumaufnahme auf das Membranpotential demonstriert werden.

In elektrophysiologischen Untersuchungen von Proteoliposomen und Sphäroplasten ließ sich der CgIK-Proteinkomplex als kaliumselektiver Kanal charakterisieren. Hierbei war bei den untersuchten Membranpotentialen zwischen  $-60$  und  $+60$  mV keine Aussagen bezüglich einer bevorzugten Stromdurchlassrichtung möglich, die für den MthK-Kanal erst bei größeren Potentialen erkennbar ist (Jiang *et al.*, 2002a; Kuo *et al.*, 2007). Da in den Messungen der *E. coli*-Sphäroplasten in den höheren Spannungsbereichen andere Aktivitäten und Störungen auftraten, konnten keine Daten erfasst werden, so dass eine mit MthK vergleichbare Rektifizierung von CgIK nicht auszuschließen ist. Diese einwärts gerichtete Rektifizierung wird im MthK-Kanal teilweise über eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Blockade vermittelt (Ye *et al.*, 2006; Zadek und Nimigean, 2006). Im Bereich der KTN-Sequenz von CgIK ist keine mögliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestelle vorhanden. Da ebenfalls die physiologische Calciumkonzentration mit rund  $70 \mu\text{M}$  (vgl. Abschnitt 6.2) in den *C. glutamicum*-Zellen ungefähr hundertmal geringer ist als die in den elektrophysiologischen Untersuchungen eingesetzte Konzentration, müsste eine eventuelle Rektifizierung über einen anderen Mechanismus gewährleistet werden. Die reversible TEA-vermittelte Inhibition der Kaliumströme durch CgIK wurde durch eine direkte Blockade des Selektivitätsfilters ausgelöst und ist für Kaliumkanäle charakteristisch (Yellen, 1987; Luzhkov und Aqist, 2001). Die abgeschätzte Leitfähigkeit von CgIK bei negativen Membranpotentialen in *E. coli*-Sphäroplasten war mit einem Wert von rund  $570$  pS größer als die Leitfähigkeit, die in Proteoliposomen mit rund  $360$  pS ermittelt wurde. Die ermittelten Leitfähigkeiten von MthK

liegen zwischen 50 und 200 pS (Jiang *et al.*, 2002; Kuo *et al.*, 2007; Parfenova *et al.*, 2006; Zadek und Nimigean, 2006) und liegen somit in einer ähnlichen Größenordnung. Die auftretenden Unterschiede können durch die voneinander abweichende Membrenumgebung begründet sein.

#### 4.6 Die KTN-Module sind essentiell am *gating* von CgIK beteiligt

Um unnötigen Verlusten des elektrochemischen Potentials entgegenzuwirken, muss der Ionenfluss über die Zellmembran effektiv reguliert werden. Dies kann auf unterschiedlichen Ebenen, vom Einzelkanal bis hin zur Gesamtheit von Kanälen und Transportern, stattfinden. Die Ebene des Einzelkanals beinhaltet die Leitfähigkeit, Offenwahrscheinlichkeit und Öffnungsdauer.

Der Verlust der C-terminalen KTN-Domäne und der löslichen KTN-Proteine von CgIK führte dazu, dass in den Ionenströmen von CgIK\_M137Stop keine Einzelkanalschaltungen mehr auftraten, sondern diese nur noch von der angelegten Spannung und der Anzahl der aktiven Proteine im *patch* bestimmt waren. Eine vergleichbare Mutation in MthK beeinflusste dessen Kanalaktivität nur unwesentlich (Li *et al.*, 2007), so dass CgIK über einen anderen *gating*-Mechanismus als MthK verfügen muss.

Für KcsA wird durch das Überkreuzen der zweiten Transmembrandomäne (TM2) im Tetramer auf der cytosolischen Seite eine Engstelle erzeugt, die als *gate* fungiert und als „*bundle crossing*“ bezeichnet wird (Doyle *et al.*, 1998). Die geschlossene Konformation von KcsA soll mittels einer Blockade der C-Termini der TM2 durch inter- und intramolekulare Wechselwirkungen mit den N-Termini der TM1, stabilisiert werden (Thompson *et al.*, 2008; Cuello *et al.*, 2010). Durch eine kleine Verschiebung, bzw. Rotationsbewegung der TM2-Helices auf der intrazellulären Seite wird der KcsA-Kanal in eine funktionell offene Konformation überführt (Perozo *et al.*, 1999). Zusätzlich kommt es innerhalb dieses *gating*-Mechanismus zu einem Konformationswechsel der innere Helix in der TM2, die beim Öffnen des Kanals an einem konservierten Glycinrest abknickt, und sich beim Schließen wieder gerade ausrichtet (Magidovich und Yifrach, 2004). Ein Austausch dieses konservierten Glycins in die Aminosäure Prolin führte in dem spannungsabhängigen Shaker-Kanal Kv 1.1 zu einer steten Öffnung (Magidovich und Yifrach, 2004), und der Kanal KcsA ist durch solche Mutationen vermehrt offen (Thompson *et al.*, 2008). Auch der MthK-Kanal beinhaltet einen ähnlichen *gating*-Mechanismus mit einem intrazellulären *gate* am Kreuzungspunkt der TM2-Helices (Jiang *et al.*, 2002b), wobei die löslichen RCK-Proteine gemeinsam mit den membrangebundenen RCK-Domänen einen zusätzlichen regulatorischen Ring bilden

(Li *et al.*, 2007).

In der Sequenz von CgIK ist hingegen kein Glycin an konservierter Stelle vorhanden. Die Anwesenheit eines Prolinrestes an dieser Position in der TM2 in CgIK könnte dafür sprechen, dass kein gelenkvermittelter *gating*-Mechanismus, sowie kein intrinsisches *gate* vorhanden sind, bzw. dass das *gate* nicht mehr selber schließen kann und stets in der geöffneten Konformation vorliegt. Der Membranteil von CgIK scheint somit nur den Permeationsweg des Kanals darzustellen. Dies könnte durch Austausch der Aminosäuren in diesem Sequenzbereich der Transmembrandomänen von CgIK und anschließenden elektrophysiologische Analysen der Varianten untersucht werden.

In elektrophysiologischen Untersuchungen von CgIK\_M137I wurden trotz fehlender separater KTN-Proteine Einzelkanalaktivitäten beobachtet, wobei allerdings dessen Leitfähigkeit geringer als beim CgIK-Kanal war. Eine Kanalfunktionalität wird ebenfalls für die Kaliumkanäle Kch aus *E. coli* und MjK2 aus *Methanococcus janaschii* nach Entfernung der löslichen KTN-, bzw. RCK-Proteine nach heterologer Expression in *E. coli* beobachtet (Kuo *et al.*, 2003; Ptak *et al.*, 2005). Während Einzelkanalschaltungen im MthK-Kanal auch ohne RCK-Domänen zu beobachten sind, also ein intrinsisches *gating* des Membranteils existiert, sind die membrangebundenen KTN-Domänen von CgIK essentiell für die Schließung und stellen somit das *gate* des Kanals dar. Gemeinsam mit den separaten KTN-Proteinen sind sie für den *gating*-Mechanismus verantwortlich.

Durch die KTN-Module von CgIK könnte ein ligandenabhängiger *gating*-Mechanismus, wie er für MthK vorgeschlagen ist (Jiang *et al.*, 2002a), vermittelt werden. Der MthK-Kanal öffnet, bzw. seine Offenswahrscheinlichkeit wird durch die Bindung des Liganden  $Ca^{2+}$  erhöht, da sich dadurch der Durchmesser des regulatorischen RCK-Rings, der aus vier C-terminalen RCK-Domänen und vier separaten RCK-Proteinen besteht, vergrößert. Im KcsA-Kanal sind die Rotationsbewegungen der TM2-Helices, und die damit zusammenhängende Vergrößerung des Durchmessers des inneren Vorraums, pH-abhängig (Perozo *et al.*, 1999). Während die membrangebundenen KTN-Domänen den Permeationsweg von CgIK blockieren könnten, wird jedoch möglicherweise nur in Anwesenheit der coassemblierten KTN-Proteine eine vollständig offene Konformation des *gates* vermittelt.

Da in der KTN-Sequenz mögliche  $Ca^{2+}$ -Bindestellen fehlen, könnten andere Liganden, wie z. B. die Nukleotide AMP oder NAD(H), deren Konzentrationen vom metabolischem Zustand der Zelle bestimmt werden, an die glycinreiche Sequenz im Rossmann Fold binden. Dadurch könnte eine Konformationsänderung der KTN-Module induziert und somit regulatorischer Einfluss auf die Offenswahrscheinlichkeit von CgIK ausgeübt werden. Inwiefern und mit

welchen Affinitäten die unterschiedlichen Nukleotide möglicherweise an den KTN-Komplex binden, könnte mit Hilfe von Bindungsanalysen mit radioaktiv markierten Nukleotiden oder spektrometrischen Messungen bei 260 und 340 nm von aufgereinigtem KTN-Protein untersucht werden.

Zusätzlich könnte der interne pH-Wert regulatorischen Einfluss haben, da sich die pH-abhängige Konformation der KTN-Proteine im Oligomerisierungsgrad bedingte. Bei tiefen pH-Werten wurde die Konformation der KTN-Module stabilisiert, die die Ausbildung dimerer Komplexe unterstützt, so dass die Offenwahrscheinlichkeit von CgIK erhöht werden würde, und der für die pH-Homöostase von *C. glutamicum* essentielle Kaliumstrom vermittelt wird. Ein neutraler pH-Wert würde hingegen ein dynamisches Gleichgewicht zwischen KTN-Dimeren und -Tetrameren fördern. Bei hohen pH-Werten würde die Konformation der KTN-Module bevorzugt sein, die zur Ausbildung ausschließlicher tetramerer KTN-Komplexen führt, und somit die Öffnungswahrscheinlichkeit des CgIK-Kanals negativ beeinflusst, um einer möglichen mit der Kaliumaufnahme verbundenen Alkalisierung entgegen zu wirken.

Für die genaue Analyse der Regulation des CgIK-Kanals könnten Bestimmungen der Offenwahrscheinlichkeit von CgIK in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen verschiedener Nukleotide und pH-Werte in elektrophysiologische Messungen dienen. Ebenfalls könnten die schon vorhandenen CgIK-Varianten mit den ausgetauschten Histidinen und Glycinen Aufschluss über die pH-Sensierung und mögliche Nukleotidbindung liefern. Eine separate Expression von *cglK* und dessen KTN-Bereich in einem Duett Vektorsystem würde weitere Variationen bei der Einfügung unterschiedlicher Aminosäureaustausche ermöglichen.

#### **4.7 Sowohl *C. glutamicum*, als auch *E. coli*-Zellen können in Abwesenheit der KTN-Module nur bedingt Kalium durch CgIK aufnehmen**

Die voneinander abweichenden Eigenschaften der CgIK-Varianten mit und ohne lösliche KTN-Proteine, bzw. membrangebundene KTN-Domänen, hatten sowohl auf *E. coli*-, als auch auf *C. glutamicum*-Zellen, die über keine genomcodierten Kaliumaufnahmesysteme mehr verfügten, unterschiedliche physiologische Auswirkungen. Der Verlust der separaten KTN-Proteine schränkte die physiologische Funktion von CgIK\_M137I in der kaliumabhängig pH-sensitiven  $\Delta cglK$ -Mutante von *C. glutamicum* teilweise ein, da diese mit der CgIK-Variante einen intermediären Wachstumsphänotyp zeigte. Ähnliche Beobachtungen sind für den Kaliumkanal Kch aus *Helicobacter pylori* gemacht worden. Es wurde ebenfalls ein

intermediärer Phänotyp bei einer Komplementation mit einer HpKch-Variante ohne separate RCK-Proteine bezüglich der Sensitivität gegenüber geringen Kaliumkonzentrationen beobachtet (Stingl *et al.*, 2007).

Der Versuch einer Expression der Transmembrandomänen von CgIK ohne die KTN-Module, CgIK\_M137Stop, hatte keine positiven physiologischen Auswirkungen auf die kaliumsensitiven *C. glutamicum*-Zellen. Da aber kein Nachweis der Proteinexpression dieser CgIK-Variante möglich war, ist keine Aussage zur Funktionalität dieser Variante in *C. glutamicum* möglich. In *E. coli* konnte sowohl die Kaliumaufnahme, als auch die heterologe Komplementation des kaliumsensitiven Wachstumsphänotyps von TK2309 durch CgIK beobachtet werden. Dabei war dies, wenn auch nur eingeschränkt, sowohl mit CgIK\_M137I ohne separate KTN-Proteine, als auch durch die ausschließlichen Transmembrandomänen ohne KTN-Module (CgIK\_M137Stop) möglich. Diese verbleibende Funktionalität ist ebenfalls für die Kaliumkanäle Kch aus *E. coli* und MjK2 aus *Methanococcus janaschii* nach Entfernung der löslichen KTN-, bzw. RCK-Proteine nach heterologer Expression in *E. coli* beobachtet worden (Kuo *et al.*, 2003; Ptak *et al.*, 2005).

Die *E. coli* TK2309-Zellen können somit wahrscheinlich über den Permeationsweg des Membranteils von CgIK auch ohne KTN-Module entlang des elektrochemischen Gradienten intern Kalium akkumulieren. Da jedoch eine Abhängigkeit zwischen der Anzahl der KTN-Module und der für die Kaliumaufnahme notwendigen externen Kaliumkonzentration bestand, sind die KTN-Module wahrscheinlich an der Regulation des Kaliumflusses beteiligt, und ihre Abwesenheit führt möglicherweise zu einem veränderten, deregulierten Energiehaushalt der Zellen. Davon scheint vor allem das Membranpotential betroffen zu sein, wie die Messungen der kaliumabhängigen Veränderung des Membranpotentials mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Disc<sub>3</sub>(5) zeigten. Nach Kaliumauswaschung betrug der interne Kaliumgehalt in den *E. coli*-Zellen 40 bis 100 mM. Bei der geringen externen Kaliumkonzentration von 0,5 mM, die in den Messungen mit der kaliumsensitiven Elektrode eingesetzt wurde, betrug das Kaliumpotential etwa +130 mV und hatte eine gegenläufige Polarität zum Membranpotential. Da der Betrag des Membranpotentials der *E. coli*-Zellen wahrscheinlich im gleichen Bereich liegt, könnten schon kleine Abweichungen des Membranpotentials oder des internen Kaliumgehalts die treibende Kraft für eine Kaliumaufnahme minimieren und somit die schlechte, bzw. eingeschränkte Kaliumaufnahme durch CgIK-Stop, bzw. CgIK\_M137I erklären.

In den experimentellen Ansätzen mit der kaliumsensitiven Elektrode wurde in den WT-Zellen von *E. coli* ein rascher Kaliumstrom gemessen, der wahrscheinlich über das Trk-

Aufnahmesystem stattfand, wobei durch die Reduktion der Trk-Transportaktivität und Aktivierung des Kaliumexports das Membranpotential reguliert wurde. In den *E. coli* TK2309-Zellen mit heterolog exprimierten *cglK* aus *C. glutamicum* wird die Durchlässigkeit der Membran für Kaliumionen von der Anzahl funktioneller CglK-Kanäle, deren Leitfähigkeit und Offenwahrscheinlichkeit bestimmt. Die Wachstumsinhibition, die bei der Überexpression von *cglK* und der *cglK\_M137I*-Variante in *E. coli* besonders bei hohen externen Kaliumkonzentrationen und langer Inkubation auftrat, könnte durch fehlenden regulatorischen Einfluss verursacht worden sein. Dem CglK-vermittelten Kaliumfluss in der *E. coli*-Zelle könnte zum einen eine intrinsische Inaktivierung von CglK, wie sie für den MthK-Kanal beschrieben (Thomson und Rothberg, 2010) ist, oder ein erhöhter Kaliumefflux (Bakker *et al.* 1987) entgegenwirken. Ob dies für CglK und *C. glutamicum*-Zellen zutrifft, könnte durch den Vergleich von Einzelkanalmessungen mit makroskopischen Strömen, z. B. in *whole cell*-Messungen analysiert werden, wobei die Dauer der Messungen einen entscheidenden Parameter darstellt.

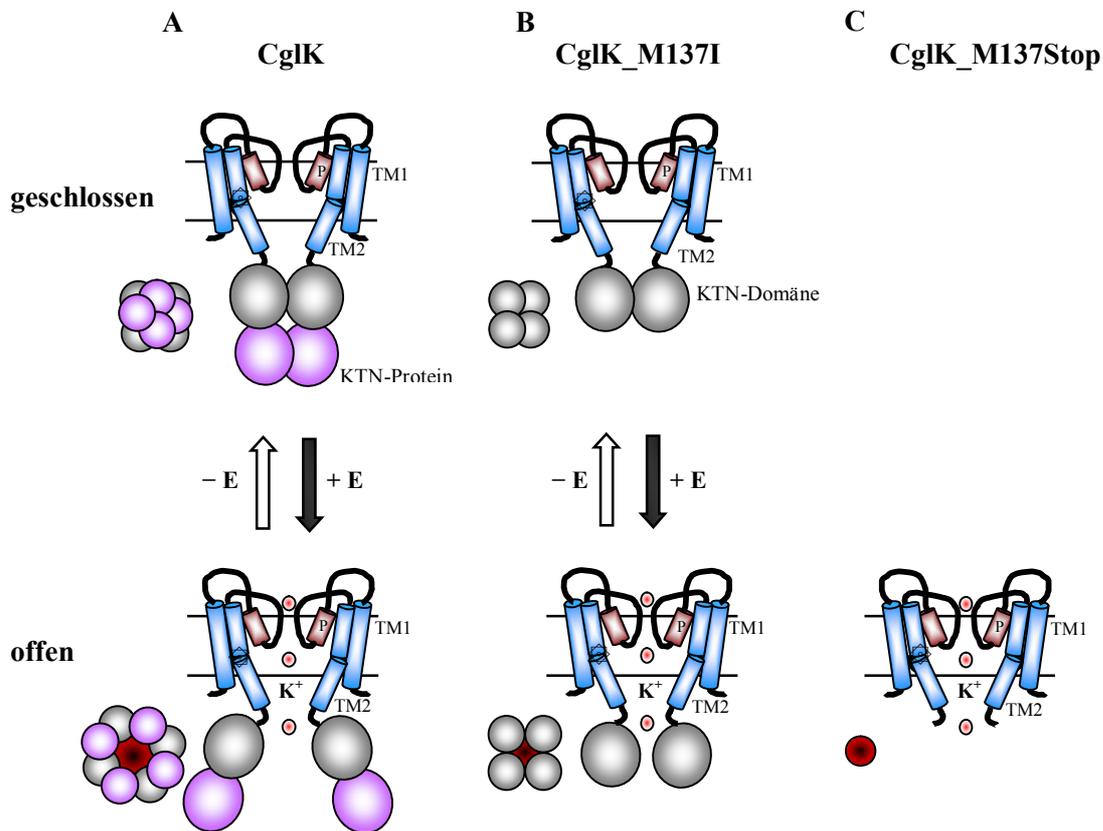
Zwischen den Einzelkanalaktivitäten von CglK und den CglK-Varianten sowie den dazugehörigen physiologischen Untersuchungen trat eine allgemeine Diskrepanz auf. Sowohl für CglK als auch für *CglK\_M137I* wurden in elektrophysiologischen Ansätzen Kanalaktivitäten gemessen, während in physiologischen Untersuchungen unterschiedliche Effekte beobachtet wurden. Der größte Kaliumeinstrom wurde in den *E. coli*-Zellen mit dem heterologen wildtypischen CglK-Kanal gemessen. Die geringere Aufnahmerate der Zelle durch die *CglK\_M137I*-Variante, trotz vergleichbar vorhandener Proteinmengen, könnte aufgrund der geringeren Leitfähigkeit erklärt werden. Während CglK-M137Stop in elektrophysiologischen Messungen als konstitutiv offener Permeationsweg für Kaliumionen fungiert, konnte erst bei ausreichend hohen externen Kaliumkonzentrationen in physiologischen Untersuchungen eine Kaliumaufnahme durch diese Variante gemessen werden. Der geringe Kaliumeinstrom durch die alleinigen Transmembrandomänen von CglK könnte durch die verminderte Proteinmenge und eine Instabilität des Proteinkomplexes in der Membran erklärt werden. Ein Hinweis auf die Instabilität gibt der Befund, dass es nicht möglich war *CglK\_M137Stop* als Komplex zu solubilisieren (Daten nicht gezeigt). Desweiteren könnte die Leitfähigkeit von *CglK\_M137Stop* wesentlich geringer als die von CglK und *CglK\_M137I* sein. Die Bestimmung der Leitfähigkeit von *CglK\_M137Stop* könnte möglicherweise in elektrophysiologische Messungen mit zeitgleicher TEA-Titration in die Badlösung, die die aktiven Komplexe einzeln blockiert, durchgeführt werden.

#### 4.8 Modell zum *gating*-Mechanismus von CgIK

Im Folgenden wurde aus den experimentellen Daten von CgIK ein Modell für dessen *gating*-Mechanismus vorgeschlagen. Der Kaliumkanal CgIK aus *C. glutamicum* setzt sich in diesem Modell aus einem oktameren Komplex zusammen, der aus vier membranintegrierten CgIK-Volllängenproteinen und vier zusätzlichen, an die cytoplasmatischen C-terminalen KTN-Domänen assemblierten, löslichen KTN-Proteinen gebildet wird (Abb. 4.1A). Die vier membranintegrierten Untereinheiten des Kanals besitzen jeweils einen strukturellen Kern aus zwei transmembranen Helices, die durch den P-Loop mit der hochkonservierten Aminosäuresequenz TVGYGD gemeinsam den Selektivitätsfilter bilden. Der membranintegrierte Teil von CgIK ist dabei ausschließlich für die Permeation, d. h. für den selektiven Transport von Kaliumionen durch die Membran verantwortlich, da aufgrund eines Prolins, welches als Helixbrecher fungiert, eine starre Abweichung der regelmäßigen Helixstruktur in der TM2 vorliegt. Die C-terminalen KTN-Domänen bilden das *gate*, welches den Zugang zum Permeationsweg durch den membranintegrierten Part von CgIK über eine cytoplasmatische Engstelle kontrolliert. In Abhängigkeit von der Konformation der KTN-Domänen ist das *gate* entweder offen und der Permeationsweg für die Kaliumionen frei passierbar, oder geschlossen, so dass der Permeationsweg blockiert wird.

Mit den zusätzlich assemblierten löslichen KTN-Proteinen bilden die KTN-Domänen gemeinsam einen oktameren Ring, der den biochemisch regulierten *gating*-Mechanismus vermittelt. Kommt es zur Bindung von Liganden an die KTN-Module, oder wird von ihnen eine Änderung des pH-Wertes detektiert, so verändert sich die KTN-Ringsstruktur, was die Offenwahrscheinlichkeit des CgIK-Kanals beeinflusst. In der CgIK\_M137I-Variante fehlen die assemblierten löslichen KTN-Proteine (Abb. 4.1B), wobei die KTN-Domänen der CgIK-Volllängenproteine immer noch als *gate* fungieren. Die Konformation der KTN-Domänen ist jedoch aufgrund der fehlenden Bindung der löslichen KTN-Proteine verändert, was die Leitfähigkeit des Kanals reduziert. Der Ringkomplex kann ebenfalls nur eingeschränkt den *gating*-Mechanismus vermitteln, und die Offenwahrscheinlichkeit von CgIK nur bedingt beeinflussen.

Sind sowohl die KTN-Proteine, als auch die KTN-Domänen am C-Terminus des CgIK-Kanals deletiert, so liegen nur noch die Transmembrandomänen mit dem integrierten Selektivitätsfilter vor (Abb. 4.1C). CgIK\_M137Stop stellt somit sowohl von der intrazellulären, als auch von der extrazellulären Seite einen frei zugänglichen Permeationsweg dar. Kaliumionen können diesen Permeationsweg durch CgIK\_M137Stop in beide Richtungen ungehindert entlang des elektrochemischen Gradienten passieren.



**Abb. 4.1: Modell zum biochemisch regulierten Gating-Mechanismus von CgIK aus *C. glutamicum*.** In der Seitenansicht mit jeweils zwei Untereinheiten sind der Kaliumkanal CgIK (A) und dessen Varianten CgIK\_M137I (B) und CgIK\_M137Stop (C) dargestellt. Durch blaue Zylinder sind die Transmembrandomänen (TM1 und TM2) und durch rote Zylinder sind die P-Loop-Regionen (P) symbolisiert. Anstelle der konservierten Glycine in den TMs2 von MthK und KcsA liegt in diesem Bereich in CgIK ein Prolin (⊙). Die grauen Kugeln stellen die membranengebundenen C-terminalen KTN-Domänen dar, während lila Kugeln die löslichen KTN-Proteine symbolisieren. Kaliumionen ( $K^+$ ) werden durch kleine Kreise mit rotem Punkt in der Mitte dargestellt. Die grauen Pfeile stehen für die Beeinflussung des Konformationswechsels in Abhängigkeit von der An- (+) oder Abwesenheit (-) eines Effektors (E). Zusätzlich sind jeweils links Frontalansichten senkrecht vom Cytoplasma aus auf den gesamten Komplex mit allen Untereinheiten dargestellt.

#### 4.9 Die Kaliumversorgung durch den CgIK-Kanal ist für *C. glutamicum* ausreichend, wird jedoch unter kaliumlimitierenden Stressbedingungen durch einen aktiven Kaliumtransporter verbessert

Unter Stressbedingungen ist eine Kaliumbedürftigkeit sowohl von bakteriellen, als auch von eukaryotischen Organismen bekannt (Epstein, 2003). In *C. glutamicum* wurde sowohl bei saurem pH-Stress, als auch unter hyperosmotischen Bedingungen das Kanalprotein CgIK als das Hauptaufnahmesystem für Kalium identifiziert. Die treibende Kraft für eine CgIK-Kanal-abhängige Kaliumaufnahme in *C. glutamicum* ist das Membranpotential, das in den Zellen rund 180 mV beträgt (Follmann *et al.*, 2009b). Anhand der Nernst-Gleichung lässt sich auf

eine Möglichkeit zur rund tausendfachen internen Akkumulation von Kalium schließen, so dass beispielsweise für die Akkumulation von 700 mM im Cytoplasma mindestens eine externe Kaliumkonzentration von 0,7 mM vorliegen muss.

Bei guter Kaliumversorgung in neutraler Umgebung war der Kaliumkanal CgIK in *C. glutamicum* für das Wachstum ausreichend. Der Vorteil dieser kanalvermittelten Kaliumaufnahme ist die energetisch günstige Kopplung an den bestehenden elektrochemischen Gradienten über der Zellmembran. Desweiteren ermöglicht der Kanal die selektive Kaliumaufnahme mit einer sehr großen Geschwindigkeit von  $10^6$  bis  $10^8$  Ionen pro Sekunde (Hick und Hick, 2009), so dass eine effektive Anpassung an sich rasch verändernde Umweltbedingungen gewährleistet ist. Die Aufnahmerate hängt u. a. von der Anzahl der Kanäle, deren Leitfähigkeit, Offenwahrscheinlichkeit und Öffnungszeit ab. Durch die Beeinflussung dieser Parameter kann der Einstrom der Kaliumionen in die Zelle reguliert werden, wenn z. B. externe Stressfaktoren eine vermehrte Kaliumakkumulation erfordern, oder bei einem ausreichend hohen internen Kaliumgehalt dem Verlust des elektrochemischen Gradienten durch eine weitere Kaliumaufnahme entgegengewirkt werden soll.

Besonders unter ungünstigen Wachstumsbedingungen, wie Salz- und pH-Stress in Kombination mit geringen externen Kaliumkonzentrationen wirkte sich der heterologe, sekundär aktive KtrAB-Kaliumtransporter aus *C. jeikeium* in *C. glutamicum* positiv auf die zelluläre Anpassung aus, was mit einer erhöhten Stressresistenz der Zellen verbunden war. Unabhängig vom Kaliumgradienten über der Membran konnten in den Zellen mit pEKEx2\_ *ktrBA*, besonders unter Stressbedingungen höhere Kaliummengen als durch den CgIK-Kanal akkumuliert werden.

Dabei ist die Transporter-vermittelte Kaliumaufnahme energetisch aufwendiger als die durch einen Kanal, da die Bewegung des Substrates an den Transport eines  $H^+$  oder  $Na^+$ -Ions entlang des Konzentrationsgefälles gekoppelt ist. Für die Cosubstrate muss der Konzentrationsgradient unter ATP-Verbrauch zuvor errichtet werden. Bei einem energetisch ungünstigen Zustand der Zelle werden diese Transportprozesse reduziert, so dass auch die sekundär gekoppelten Transportvorgänge vermindert werden. Die Kaliumaufnahme wird u. a. durch die Anzahl der Transporter und durch die Transportrate, die durch die Affinität des Carriers zum Kaliumion limitiert wird, bestimmt. Die Geschwindigkeit der Kaliumaufnahme durch einen Carrier ist dabei wesentlich langsamer als durch einen Kanal (Hick und Hick, 2009).

Das Auftreten von Kanälen und/oder Carriern für die Kaliumaufnahme steht sehr wahrscheinlich im Zusammenhang mit dem Habitat des Organismus. Für die im Boden

vorkommenden Stressbedingungen und Kaliumkonzentrationen ist CgIK in *C. glutamicum* ausreichend. Der Bedarf eines aktiven Kaliumtransportsystems in *C. glutamicum* ist nicht offensichtlich. Durch die Regulation der vorhandenen CgIK-Kaliumkanäle könnte sich die *C. glutamicum*-Zelle schnell und energetisch günstig an sich rasch ändernde Umweltbedingungen anpassen. Für die Besiedlung von Habitaten, in denen extreme pH-Werte, Kaliumarmut und/oder osmotische Stressbedingungen herrschen, ist *C. glutamicum* nicht geeignet und tritt in solchen Regionen nicht auf. Vielmehr kommen dort Bakterien vor, die über aktive Kaliumtransporter verfügen und diese zur Kaliumaufnahme verwenden. Dies trifft beispielsweise für die pathogenen Vertreter der Gattung der Actinomyceten zu, für die eine effektive Akkumulation von Kalium für das Überleben im Milieu ihres Wirtes essentiell ist (Stingl *et al.*, 2007). Dazu gehört unter anderem auch der pathogene Organismus *Corynebacterium jeikeium* (Funke *et al.*, 1997), der auf der Haut hohen Salzkonzentrationen und einem tiefem pH-Werten von 5,0 in der Anwesenheit von rund 5-10 mM Kalium ausgesetzt sein kann (Tietz, 1987). Das gleichzeitige Auftreten eines Kaliumkanals und Kaliumtransportern, wie in *C. diphtheriae*, der neben einem Kaliumkanal vom CgIK-Typ und einen KtrAB-Transportsystem zusätzlich über ein ATP-abhängiges Kdp-System verfügt, würde dabei wahrscheinlich die bestmögliche Anpassung an wechselnde Bedingungen und Bedürfnisse ermöglichen.

Dabei könnten eine genauere Charakterisierung, sowie eine nähere Betrachtung des Vorkommens von bakteriellen Kaliumtransportern und Kaliumkanälen, aufgrund fehlender homologer Proteine in eukaryotischen Zellen, für die Bekämpfung von Pathogenen relevant sein. Beispielsweise könnten möglicherweise Inhibitoren, die spezifisch diese Carrier oder Kanäle hemmen, die bisherigen, teilweise schon unwirksamen Antibiotika ersetzen oder ergänzen.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zu Mechanismen der physiologischen Antwort von *Corynebacterium glutamicum* auf tiefe pH-Werte und Osmostress durchgeführt. Dabei wurde bei niedrigen pH-Werten eine Störung der Thiolhomöostase durch eine pH-Wert abhängige Regulation und Aktivität der Cystathionin- $\beta$ -Lyase aufgeklärt. Desweiteren wurde die endogene Produktion von  $H_2O_2$  und das damit verbundene Auftreten von oxidativem Stress während der pH-Stressantwort von *C. glutamicum* erstmals nachgewiesen. Zusätzlich ist Kalium essentiell für das Wachstum von *C. glutamicum* bei tiefen pH-Werten, da es unter anderem einen stimulierenden Effekt auf die Atmungskettenaktivität bei niedrigen pH-Werten hat. Unter hyperosmotischen Bedingungen ist Kalium ebenfalls für das optimale Wachstum von *C. glutamicum* notwendig. Das intern akkumuliert Kaliumionen trägt entscheidend zum internen Osmolytpool in den *C. glutamicum*-Zellen unter Osmostressbedingungen bei. Die positive Ladung der Kaliumionen wird jedoch nicht durch entsprechende Konzentrationen an Glutamat kompensiert. In Abhängigkeit zum Osmostress vermittelt Kalium die Expression der Gene *betP* und *proP*, die Transporter für die Aufnahme von kompatiblen Solute codieren und an der Osmoadaptation der Zellen maßgeblich beteiligt sind.

Sowohl bei tiefen pH-Werten, als auch unter hyperosmotischen Bedingungen wurde in *C. glutamicum* für den Kaliumkanal CgIK, jedoch nicht für das putative sekundär aktive Kup-System, eine essentielle Funktion in der Stressantwort der Zellen nachgewiesen. Die Funktion von CgIK als Kaliumtransporter wurde in Zellen von *C. glutamicum* und *E. coli* demonstriert. Es wurde gezeigt, dass die mRNA von *cgIK* in ein membranintegriertes CgIK-Protein und in ein separates lösliches KTN-Protein translatiert wird. Der CgIK-Komplex setzt sich sehr wahrscheinlich aus vier CgIK-Proteinen und vier coassemblierten KTN-Proteinen zusammen. Dabei fungiert CgIK als kaliumspezifischer Kanal. Für die C-terminalen KTN-Domänen der CgIK-Proteine ist eine essentielle Beteiligung an der Schließung des CgIK-Kanals nachgewiesen worden, und für die separaten KTN-Proteine wurde eine pH-abhängige Komplexbildung gezeigt. Zusätzlich führt die Anwesenheit der löslichen KTN-Proteine zur Erhöhung der Leitfähigkeit des CgIK-Kanals, was auf eine Beteiligung an der Regulation der Kanalaktivität hinweist. Für den *gating*-Mechanismus und die Regulation des CgIK-Kanals wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem die C-terminalen KTN-Domänen die Funktion eines *gates* übernehmen sollen. Gemeinsam mit den separaten KTN-Proteinen würden die KTN-Domänen einen dynamischen oktameren KTN-Ring bilden, der die Offenwahrscheinlichkeit des CgIK-Kanals reguliert.

Anschließend wurden für *C. glutamicum* Vor- und Nachteile bei der Verwendung von Kanälen, bzw. Transportern für die Kaliumaufnahme untersucht. Unter Stressbedingungen bei Kaliummangel wurde ein positiver Effekt des heterolog exprimierten aktiven Kaliumtransporters KtrAB aus *C. jeikeium* auf die Stressresistenz von *C. glutamicum* verzeichnet. Bei guter Kaliumversorgung ist hingegen die ausschließliche Nutzung des CgIK-Kanals zur Kaliumaufnahme sowohl für das Wachstum unter Stressbedingungen, als auch für die Aminosäureproduktion von *C. glutamicum*, ausreichend.

## 6 Anhang

### 6.1 Peptide Mass Fingerprints der aufgereinigten Proteine der *cglK*-Expression

Die Proteinbanden der beiden 27 und 40 kDa großen, aufgereinigten Proteine nach der Expression von *cglK* im Vektor pET52b in BL21 *E. coli*-Zellen mit einer C-terminalen His-Markierung, wurden aus dem SDS-Gel ausgestochen und mit Hilfe von *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) in der Zentralen Bioanalytik (ZBA) des Zentrums für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) analysiert, und deren Aminosäureabfolge (Abb. 6.1) bestimmt.

#### 36 kDa (CglK-Vollängen-Protein):

1 MGR**MKNDGEL ADLPDHALLS IIRIPQAAKR SPWALILTRI** GYAMVLLVIV  
 51 TMVVYFDRNG YSEDLTFIDA LYYSTVSLTT VGYGDITPVT QSARLINIIV  
 101 **LTPARIGFLI** LLVGTTL SVL TEESRRALQI QRWRKRM**RNH TVVVGYG**TKG  
 151 R**SAVA**AALLAD GVPANQIVVI DTDQVSLDAA NNSGLVTVKG SATKADVLRL  
 201 AGVSRAR**AVV VAPNLDDTAV LVTLSVREIA PQAMIVASVR ESENQHLL**EQ  
 251 **SGADSVVISS ETAGRMLGLA TVTPSVVEMM EDLLSPDEGF SVAERLVGED**  
 301 **EIGSNPRHLA DIVLGVVRS**G ELYRIDS**PEA ETVEPGDRLL YVRRVFSEE**V  
 351 NDK

#### 27 kDa (KTN-Protein):

1 MGR**MKNDGEL ADLPDHALLS IIRIPQAAKR SPWALILTRI** GYAMVLLVIV  
 51 TMVVYFDRNG YSEDLTFIDA LYYSTVSLTT VGYGDITPVT QSARLINIIV  
 101 **LTPARIGFLI** LLVGTTL SVL TEESRRALQI QRWRK**MRNH TVVVGYG**TKG  
 151 **RSVA**AALLAD GVPANQIVVI DTDQVSLDAA NNSGLVTVKG SATKADVLRL  
 201 AGVSRAR**AVV VAPNLDDTAV LVTLSVREIA PQAMIVASVR ESENQHLL**EQ  
 251 **SGADSVVISS ETAGRMLGLA TVTPSVVEMM EDLLSPDEGF SVAERLVGED**  
 301 **EIGSNPRHLA DIVLGVVRS**G ELYRIDS**PEA ETVEPGDRLL YVRRVFSEE**V  
 351 NDK

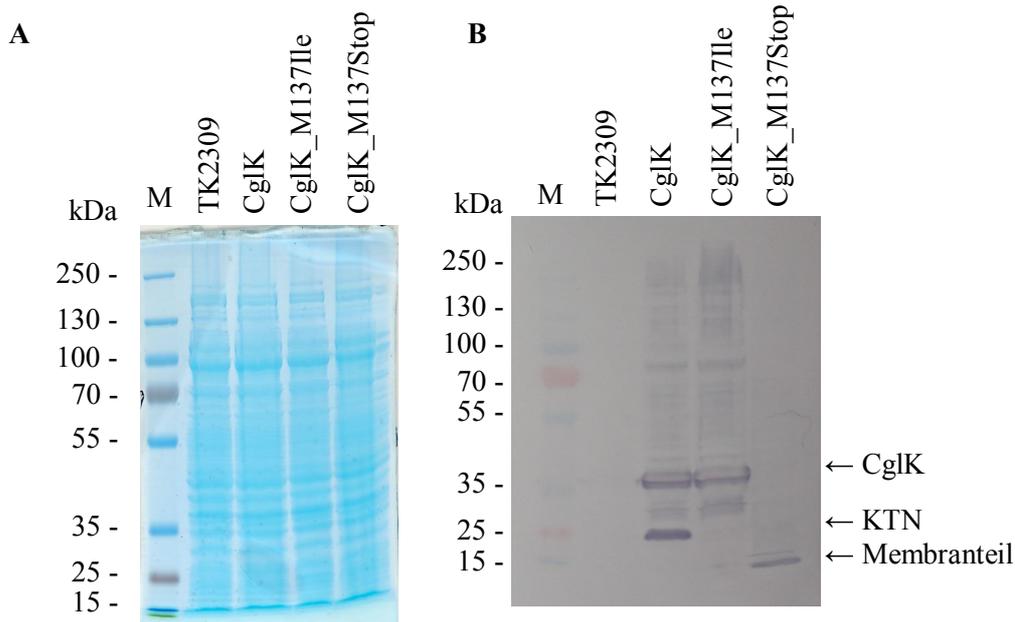
**Abb. 6.1:** Ergebnisse des *Peptide Mass Fingerprints* (PMF) der aufgereinigten Proteinbanden aus dem *E. coli* Lysats der *cglK*-Überexpression. In rot/fett hervorgehoben sind die Übereinstimmungen der AS-Abfolge der isolierten Proteinbanden zu denen des CglK-Proteins.

### 6.2 Bestimmung der internen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in *C. glutamicum*

Die Bestimmung der internen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in *C. glutamicum*-Zellen mittels Atomabsorptionsspektrometrie am Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene in Köln zeigte, dass diese nach achtstündigem Wachstum in Minimalmedium bei pH 7,5 rund 70  $\mu\text{M}$ , bei pH 6,0 50  $\mu\text{M}$  und bei pH 9,0 35  $\mu\text{M}$  betrug.

### 6.3 SDS-PAGE und Western Blot der in den Messungen des Membranpotentials verwendeten Zellen

Die *E. coli*-Zellen, die in den Messungen des Membranpotentials verwendet wurden (Abschnitt 3.4.5), sind durch Hitzebehandlung aufgeschlossen und in einer SDS-PAGE aufgetrennt, sowie in einem anschließendem Western Blot analysiert worden (Abb. 6.2).



**Abb. 6.1: SDS-PAGE (B) und Western Blot (A)** mit jeweils 15 µg des Gesamtproteinextraktes der Stämme TK2309, TK2309\_pTrc\_cglK, TK2309\_pTrc\_cglK\_M137I und TK2309\_pTrc\_cglK\_M137Stop, die in den Membranpotentialmessungen mit DiSC<sub>3</sub>(5) verwendet wurden. M=Marker.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abe S., Takayama K. und Kinoshita S. (1967)** Taxonomical studies on glutamic acid producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 13: 279-301
- Aidley D. und Stanfield P. (1996)** Ion Channels-Molecules in Action. *Cambridge University Press*, Cambridge
- Ambesi A., Miranda M., Petrov V. V. und Slayman C. W. (2000)** Biogenesis and function of the yeast plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *The Journal of experimental biology* 1: 155-160
- Anderson J. A., Huprikar S. S., Kochian L. V., Lucas W. J. und Gaber R. F. (1992)** Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3736-3740
- Balaji B., O'Connor K., Lucas J. R., Anderson J. M. und Csonka L. N. (2000)** Timing of induction of osmotically controlled genes in *Salmonella enterica* serovar typhimurium, determined with quantitative real-time reverse transcription-PCR. *Appl Environ. Microbiol.* 71: 8273-8283
- Becker M. (2007)** Untersuchungen zum Kaliumtransport in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Universität zu Köln
- Berneche S. und Roux B. (2001)** Energetics of ion conduction through the K<sup>+</sup> channel. *Nature* 414: 73-7
- Booth I. R. und Kroll R. G. (1983)** The relationship between intracellular pH, the pH gradient and potassium transport in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 216: 709-16
- Booth I. R. (1985)** Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.* 49: 359-78
- Bossemeyer D., Schlosser A. und Bakker E. P. (1989)** Specific cesium transport via the *Escherichia coli* Kup (TrkD) K<sup>+</sup> uptake system. *J. Bacteriol.* 171: 2219-21
- Boyer P. D., Cross R. L. und Momsen W. (1973)** A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70: 2837-9
- Bradford M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Bremer E. und Krämer R. (2000)** Coping with osmotic challenges: Osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. *Bacterial Stress Responses* (Storz, G. und Hengge-Aronis, R., Herausgeber) *ASM Press* 77-97
- Buurman E. T., Pennock J., Tempest D. W., Teixeira de Mattos M. J. und Neijssel O. M. (1989)** Replacement of potassium ions by ammonium ions in different micro-organisms grown in potassium-limited chemostat culture. *Arch. Microbiol.* 152: 58-63
- Chakrapani S. und Perozo E. (2007)** How to gate an ion channel: lessons from MthK. *Nature* 3: 180-182
- Cotter P. D. und Hill C. (2003)** Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 3: 429-53
- Cuello L. G., Jogini V., Cortes D. M., Sompornpisut A., Purdy M. D., Wiener M. C. und Perozo E. (2010)** Design and characterization of a constitutively open KcsA. *FEBS Lett.* 584: 1133-1138
- Dinnbier U., Limpinsel E., Schmid R. und Bakker E. P. (1988)** Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch. Microbiol.* 150: 348-357

- Doyle D. A., Morais Cabral J., Pfuetzner R. A., Kuo A., Gulbis J. M., Cohen S. L., Chait B. T. und MacKinnon R. (1998)** The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 280: 69-77
- Durell S. R., Hao Y., Nakamura T., Bakker E. P. und Guy H. R. (1999)** Evolutionary relationship between K(+) channels and symporters. *Biophys. J.* 77: 775-788
- Durell S. R., Bakker E. P. und Guy H. R. (2000)** Does the KdpA subunit from the high affinity K<sup>+</sup>-translocating P-type KDP-ATPase have a structure similar to that of K<sup>+</sup> channels? *Biophys. J.* 78: 188-99
- Eikmanns B. J., Kleinertz E., Liebl W. und Sahn H. (1991)** A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene* 102: 93-8
- Ennis H. L. und Lubin M. (1961)** Dissociation of ribonucleic acid and protein synthesis in bacteria deprived of potassium. *Biochim Biophys Acta*: 50399-402
- Epstein W. und Kim B. S. (1971)** Potassium transport loci in *Escherichia coli*. *Jl of Bacteriol.* 108: 639-644
- Epstein W. (1986)** Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 39: 73-78
- Epstein W. (2003)** The roles and regulation of potassium in bacteria. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 75: 293-320
- Facklam R. R., Lawrence D. N. und Sottnek F. O. (1978)** Modified culture technique for *Corynebacterium diphtheriae* isolation from desiccated swabs. *J. Clin. Microbiol.* 7:137-8
- Fisher K., Petersen J., Mitchell C. J. und Lowe D. J. (2002)** Multiple inequivalent metal-nucleotide coordination environments in the presence of the VO<sup>2+</sup>-inhibited nitrogenase iron protein: pH-dependent structural rearrangements at the nucleotide binding site. *Biochemistry* 44: 13253-63
- Flynn G. E. und Zagotta W. N. (2001)** Conformational changes in S6 coupled to the opening of cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* 30: 689-698
- Follmann M., Becker M., Ochrombel I., Ott V., Krämer R. und Marin K. (2009a)** Potassium transport in *Corynebacterium glutamicum* is facilitated by the putative channel protein CglK, which is essential for pH homeostasis and growth at acidic pH. *J. Bacteriol.* 191: 2944-52
- Follmann M., Ochrombel I., Krämer R., Trötschel C., Poetsch A., Rückert C., Hüser A., Persicke M., Seiferling D., Kalinowski J. und Marin K. (2009b)** Functional genomics of pH homeostasis in *Corynebacterium glutamicum* revealed novel links between pH response, oxidative stress, iron homeostasis and methionine synthesis. *BMC Genomics* 10: 621
- Funke G., von Graevenitz A., Frommelt L. und Pünter-Streit V. (1998)** Diversity of coryneforms found in infections following prosthetic joint insertion and open fractures. *Infection.* 1: 36-8
- Fränzel B., Trötschel C., Rückert C., Kalinowski J., Poetsch A. und Wolters D. A. (2010)** Adaptation of *Corynebacterium glutamicum* to salt-stress conditions. *Proteomics* 10: 445-57
- Grant S., Jessee J., Bloom F. und Hanahan D. (1990)** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. USA.* 87: 4645-4649
- Gralla J. D. und Vargas D. R. (2006)** Potassium glutamate as a transcriptional inhibitor during bacterial osmoregulation. *EMBO J.* 25: 1515-21
- Guillouet S. und Engasser J. M. (1996a)** Sodium and praline accumulation in *Corynebacterium glutamicum* as a response to an osmotic saline upshock. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 315-320
- Guillouet S. und Engasser J. M. (1996b)** Growth of *Corynebacterium glutamicum* in ammonium- and potassium-limited continuous cultures under high osmotic pressure *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46: 291-296

- Hamill O. P., Marty A., Neher E., Sackmann B. und Sigworth F. J. (1981)** Improved patch clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membranepatches. *Pflügers Arch.* 391: 85-100
- Haynes J. und Britz M. (1989)** Electrotransformation of *Brevibacterium lactofermentum*: growth in Tween 80 increases transformation frequencies. *FEMS Microbiol. Lett.* 61: 329-334
- Heginbotham L., Lu Z., Abramson T. und MacKinnon R. (1994)** Mutations in the K<sup>+</sup> channel signaturesequence. *Biophys. J.* 66: 1061-1067
- Heginbotham L., Odessey E. und Miller C. (1997)** Tetrameric stoichiometry of a prokaryotic K<sup>+</sup>-channel. *Biochemistry.* 36:10335-42
- Heuberger E. H., Veenhoff L. M., Duurkens R. H., Friesen R. H. und Poolman B. (2002)** Oligomeric state of membrane transport proteins analyzed with blue native electrophoresis and analytical ultracentrifugation. *J. Mol. Biol.* 317: 591-600
- Hille B. (1986)** Ionic channels: molecular pores of excitable membranes. *Harvey Lect.* 82: 47-69
- Hille B. (2001)** Ion channels of excitable membranes. *Sinauer Associates Inc., Sunderland*
- Holtmann G., Bakker E. P., Uozumi N. und Bremer E. (2003)** KtrAB and KtrCD: two K<sup>+</sup> uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity. *J. Bacteriol.* 185: 1289-1298
- Imlay J. A. (2008)** Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu. Rev. Biochem.* 77: 755-76
- Jakob K., Satorhelyi P., Lange C., Wendisch V. F., Silakowski B., Scherer S. und Neuhaus K. (2007)** Gene expression analysis of *Corynebacterium glutamicum* subjected to long-term lactic acid adaptation. *J. Bacteriol.* 15: 5582-5590
- Jan L.Y. und Jan Y. N. (1992)** Structural elements involved in specific K<sup>+</sup> channel functions. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 537-555
- Jiang Y., Lee A., Chen J., Cadene M., Chait B. T. und MacKinnon R. (2002a)** Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417: 515-522
- Jiang Y., Lee A., Chen J., Cadene M., Chait B. T. und MacKinnon R. (2002b)** The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 417: 523-6
- Jung K. und Altendorf K. (1998)** Truncation of amino acids 12-128 causes deregulation of the phosphatase activity of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 273: 17406-10
- Kase H. und Nakayama K. (1975)** L-methionine production by methionine analog resistant mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Agr. Biol. Chem.* 39: 153-160
- Kashket E. (1985)** The proton motive force in bacteria: a critical assessment of methods. *Ann. Rev. Micro.* 39: 219-242
- Kim Y. J. (2002)** Respiratory chain-linked components of the marine bacterium *Vibrio alginolyticus* affect each other. *J. Microbiol.* 40: 125-128
- Koch, A. (1983)** The surface stress theory of microbial morphogenesis. *Adv. Microbiol. Physiol* 24: 301-336
- Krämer R., Lambertb C., Hoischen C. und Ebbighausen H. (1990)** Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. 1. Kinetic properties and regulation by internal pH and potassium. *Eur. J. Biochem.* 194: 929-35
- Kroll R. und Booth I. R. (1981)** The role of potassium transport in the generation of a pH gradient in *Escherichia coli*. *Biochem J.* 198: 691-698
- Kröning N., Willenborg M., Tholema N., Hanelt I., Schmid R und Bakker E. P. (2007)** ATP binding to the KTN/RCK subunit KtrA from the K<sup>+</sup> -uptake system KtrAB of *Vibrio alginolyticus*: its role in the formation of the KtrAB complex and its requirement *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 282: 14018-27

- Kung C. und Blount P. (2004)** Channels in microbes: so many holes to fill. *Mol Microbiol* 53: 373-80
- Kuo M. M., Saimi Y. und Kung C. (2003)** Gain-of-function mutations indicate that *Escherichia coli* Kch forms a functional K<sup>+</sup> conduit *in vivo*. *Embo J.* 22: 4049-4058
- Kuo M. M., Haynes W. J., Loukin S. H., Kung C. und Saimi Y. (2005)** Prokaryotic K<sup>+</sup>-channels: from crystal structures to diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 961-85
- Kuo M. M., Baker K. A., Wong L. und Choe S. (2007)** Dynamic oligomeric conversions of the cytoplasmic RCK domains mediate MthK potassium channel activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 7: 2151-2156
- Laemmli U. K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 5259: 680-685
- Leuchtenberger W., Huthmacher K. und Drauz K. (2005)** Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 1-8
- Li H. L., Sui H. X., Ghanshani S., Lee S., Walian P. J., Wu C. L., Chandy K. G. und Jap B. K. (1998)** Two-dimensional crystallization and projection structure of KcsA potassium channel. *J. Mol. Biol.* 282: 211-6
- Li Y., Berke I., Chen L. und Jiang Y. (2007)** Gating and inward rectifying properties of the MthK K<sup>+</sup> channel with and without the gating ring. *The Journal of general physiology* 2: 109-120.
- Liebl W., Bayerl A., Schein B., Stillner U. und Schleifer K. H. (1989)** High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 65: 299-330
- Lindroth P. und Mopper K. (1979)** High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde. *Anal. Chem.* 51: 1667-1674
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. und Randall R. J. (1951)** Protein measurement with the phenol reagent. *J. Biol. Chem* 193: 265-275
- Löffler G., Petrides P. E. und Heinrich P. C. (2007)** Biochemie und Pathobiochemie. 8. Aufl., Verlag Springer Berlin
- Lu S. C. (2000)** S-Adenosylmethionine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32: 391-395
- Luzhkov V. B. und Aqvist J. (2001)** Mechanisms of tetraethylammonium ion block in the KcsA potassium channel. *FEBS Lett.* 495: 191-6
- MacKinnon R. (1991)** Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 350: 232-23
- MacKinnon R., Zhou M., Morais-Cabral J. H. (2001)** Energetic optimization of ion conduction rate by the K<sup>+</sup> selectivity filter. *Nature* 414: 37-42
- Magidovich E. und Yifrach O. (2004)** Conserved Gating Hinge in Ligand- and Voltage-Dependent K<sup>+</sup> Channels. *Biochemistry* 43: 13242-13247
- Martinac B., Buechner M., Delcour A. H., Adler J. und Kung C. (1987)** Pressure-sensitive ion channel in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2297-2301
- Matsuda N., Kobayashi H., Katoh H, Ogawa T., Futatsugi L., Nakamura T., Bakker E. P. und Uozumi N. (2004)** Na<sup>+</sup>-dependent K<sup>+</sup> uptake Ktr system from the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803 and its role in the early phases of cell adaptation to hyperosmotic shock *J. Biol. Chem.* 279: 54952-62
- McEwan A. G. (2009)** New insights into the protective effect of manganese against oxidative stress. *Mol Microbiol.* 72: 812-4

- McLaggan D., Naprstek J., Buurman E. T. und Epstein W. (1994)** Interdependence of K<sup>+</sup> and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 269: 1911-1917
- Meury J. (1994)** Immediate and transient inhibition of the respiration of *Escherichia coli* under hyperosmotic shock. *FEMS Microbiol. Lett.* 121: 281-286
- Miller C. (1992)** Ion channel structure and function. *Science* 258: 240-241
- Minnikin D. (1982)** The biology of the mycobacteria. *Academic. Pr. 1*: 95-184
- Möker N., Brocker M., Schaffner S., Krämer R., Morbach S. und Bott M. (2004)** Deletion of two genes encoding the MtrA-MtrB two-component system of *Corynebacterium glutamicum* has strong influence on cell morphology, antibiotics susceptibility and expression of genes involved in osmoprotection. *Mol. Microbiol.* 54: 420-438
- Möker N., Krämer J., Unden G., Krämer R. und Morbach S. (2007)** *In vitro* analysis of the two-component system MtrB-MtrA from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 189: 3645-3649
- Mullis K., Faldoma F., Scharf S., Saiki R., Horn G. und Erlich H. (1986)** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 51: 263-273
- Neher E. und Sakmann B. (1976)** Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle muscle fibres. *Nature* 260: 799-802
- Nakamura T., Yuda R., Unemoto T. und Bakker E. P. (1998)** KtrAB, a new type of bacterial K<sup>+</sup> uptake system from *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.* 180: 3491-4
- Nissen P., Hansen J., Ban N., Moore P. B. und Steitz T. A. (2000)** The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289: 920-930
- Numberger M. und Draguhn A. (1996)** Patch-Clamp Technik. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg
- Ochrombel I., Ott L., Krämer R., Burkovski A. und Marin K. (2011)** Impact of improved potassium transport and accumulation on pH homeostasis, membrane potential adjustment and survival of *Corynebacterium glutamicum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1807: 444-50
- Ott V. (2009)** Der Regulationsmechanismus des Osmosensors BetP aus *Corynebacterium glutamicum* Dissertationsschrift, Universität zu Köln
- Ogahara T., Ohno M., Takayama M., Igarashi K. und Kobayashi H. (1995)** Accumulation of glutamate by osmotically stressed *Escherichia coli* is dependent on pH. *J. Bacteriol.* 177: 5987-5990
- Page R. D. (1996)** TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12: 357-8
- Park S. und Imlay J. A. (2003)** High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the fenton reaction. *J. Bacteriol.* 185: 1942-1950
- Parfenova L. V., Crane B. M. und Rothberg B. S. (2006)** Modulation of MthK potassium channel activity at the intracellular entrance to the pore. *J. Biol. Chem.* 30: 21131-8
- Parsegian A. (1969)** Energy of an ion crossing a low dielectric membrane: solutions to four relevant electrostatic problems. *Nature* 221: 844-846
- Perozo E., Cortes D. M. und Cuello L. G. (1999)** Structural Rearrangements Underlying K<sup>+</sup>-Channel Activation Gating. *Science* 285: 73-78
- Peter H., Burkovski A. und Krämer R. (1996)** Isolation, characterization and expression of the *Corynebacterium glutamicum betP* gene, encoding the transport system for the compatible solute glycine betaine. *J. Bacteriol.* 178: 5229-5234

- Peter H., Weil B., Burkovski A., Krämer R. und Morbach S. (1998)** *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: identification, sequencing and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine Carrier, EctP. *J. Bacteriol.* 180: 6005-601
- Potts M. (1994)** Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev.* 58: 755-805
- Ptak C. P., Cuello L. G. und Perozo E. (2005)** Electrostatic interaction of a K<sup>+</sup> channel RCK domain with charged membrane surfaces. *Biochemistry* 44: 62-71
- Reed R. H., Warr S. R. C., Richardson D. L. und Stewart W. D. P. (1985)** Multiphasic osmotic adjustment in a euryhaline cyanobacterium. *FEMS Microbiol Lett.* 28: 225-229
- Rey D. A., Nentwich S. S., Koch D. J., Rückert C., Pühler A., Tauch A. und Kalinowski J. (2005)** The McbR repressor modulated by the effector substance S-adenosylhomocysteine controls directly the transcription of a regulon involved in sulphur metabolism of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Mol. Microbiol.* 4: 871-887
- Rhoads D. B., Waters F. B. und Epstein W. (1976)** Cation transport in *Escherichia coli* VIII. Potassium transport mutants. *J. Gen. Physiol.* 67: 325-41
- Rhoads D.B. und Epstein W. (1977)** Energy coupling to net K<sup>+</sup> transport in *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* 252: 1394-401
- Rossmann M. G., Liljas A., Brandén C. I. und Banaszak L. J. (1975)** Evolutionary and structural relationships among dehydrogenases. *The Enzymes* 3: 61-102
- Rönsch H., Krämer R. und Morbach S. (2003)** Impact of osmotic stress on volume regulation, cytoplasmatic solute composition and lysine production in *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B, *J. Biotechnol.* 104: 87-97
- Roe A. J., O'Byrne C., McLaggan D. und Booth I.R. (2002)** Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. *Microbiology* 148: 2215-2222
- Roosild T. P., Miller S., Booth I. R. und Choe S. (2002)** A mechanism of regulating transmembrane potassium flux through a ligand-mediated conformational switch. *Cell.* 109: 781-91
- Roosild T. P., Castronovo S., Miller S., Li C., Rasmussen T., Bartlett W., Gunasekera B., Choe S. und Booth I. R. (2009)** KTN (RCK) domains regulate K<sup>+</sup> channels and transporters by controlling the dimer-hinge conformation. *Structure* 17: 893-903
- Rottenberg H. (1979)** The measurement of membrane potential and pH in cells, organelles, and vesicles. *Meth. Enzymol.* LV: 547-569
- Rowland G. C., Giffard P. M. und Booth I. R. (1984)** Genetic studies of the *phs* locus of *Escherichia coli*, a mutation causing pleiotropic lesions in metabolism and pH homeostasis. *FEBS Letters* 173: 295-300
- Rübenhagen R., Morbach S. und Krämer R. (2001)** The osmoreactive betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* is a sensor for cytoplasmic K<sup>+</sup>. *EMBO J.* 20: 5412-20
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higushi R., Horn G. T., Mullis K. B. und Erlich H. A. (1988)** Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 23: 487-491
- Sambrook J., Fritsch E. F. und Maniatis T. (1989)** Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saum S. H. und Müller V. (2007)** Salinity-dependent switching of osmolyte strategies in a moderately halophilic bacterium: glutamate induces proline biosynthesis in *Halobacillus halophilus*. *J. Bacteriol.* 189: 6968-75

- Schiller D., Rübenhagen R., Krämer R. und Morbach S. (2004)** The C-terminal domain of the betaine carrier BetP of *Corynebacterium glutamicum* is directly involved in sensing K<sup>+</sup> as an osmotic stimulus. *Biochem. 43*: 5583-91
- Schaffner W. und Weissmann C. (1973)** A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal. Biochem. 56*: 502-14
- Schägger H. und von Jagow G. (1991)** Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem. 2*: 223-31
- Seaver L. C. und Imlay J. A. (2001)** Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol. 24*: 7173-81
- Seaver L. C. und Imlay J. A. (2004)** Are respiratory enzymes the primary sources of intracellular hydrogen peroxide? *J. Biol. Chem. 47*: 48742-50
- Sentenac H., Bonneaud N., Minet M., Lacroux F., Salmon J. M., Gaymard F. und Grignon C. (1992)** Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science 256*: 663-665
- Shabala L., Bowman J., Brown J., Ross T., McMeekin T. und Shabala S. (2009)** Ion transport and osmotic adjustment in *Escherichia coli* in response to ionic and non-ionic osmotica. *Environ. Microbiol. 1*: 137-48
- Slonczewski J. und Foster J. (1996)** pH regulated genes and survival at extreme pH. *Escherichia coli and Salmonella 1*: 1539-1549
- Solomon A. K. und Schultz S. G. (1961)** Cation transport in *Escherichia coli*: Intracellular Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> concentrations and net cation movement. *J Gen Physiol. 45*: 355-69
- Stackebrandt E., Rainey F. und Ward-Rainey N. (1997)** Proposal of a new hierarchic classification system. *Actinobacteria classis nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 47*: 479-491
- Stingl K., Brandt S., Uhlemann E. M., Schmid R., Altendorf K., Zeilinger C., Ecobichon C., Labigne A., Bakker E. P. und de Reuse H. (2007)** Channel-mediated potassium uptake in *Helicobacter pylori* is essential for gastric colonization. *EMBO J. 26*: 232-41
- Studier F. W. und Moffatt B. A. (1986)** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol. 189*: 113-130
- Stumpe S., Schlösser M., Schleyer M. und Bakker E. P. (1996)** K<sup>+</sup> circulation across the prokaryotic cell membrane: K<sup>+</sup>-uptake systems. *Handb. Biol. Phys. 2*: 473-499
- Suelter C. H. (1970)** Enzymes activated by monovalent cations. *Science. 168*: 789-95
- Tolema N., Bakker E. P., Suzuki A. und Nakamura T. (1999)** Change to alanine of one out of four selectivity filter glycines in KtrB causes a two orders of magnitude decrease in the affinities for both K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> of the Na<sup>+</sup> dependent K<sup>+</sup> uptake system KtrAB from *Vibrio alginolyticus*. *FEBS Lett. 450*: 217-220
- Tolema N., Vor der Brüggen M., Mäser P., Nakamura T., Schroeder J. I., Kobayashi H., Uozumi N. und Bakker E. P. (2005)** All four putative selectivity filter glycine residues in KtrB are essential for high affinity and selective K<sup>+</sup> uptake by the KtrAB system from *Vibrio alginolyticus*. *J. Biol. Chem. 280*: 41146
- Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F. und Higgins D.G (1997)** The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res. 25*: 4876-82
- Thompson A. N., Posson D. J., Parsa P. V. und Nimigeon C. M. (2008)** Molecular mechanism of pH sensing in KcsA potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105*: 6900-6905
- Thomson A. S. und Rothberg B. S. (2010)** Voltage-dependent inactivation gating at the selectivity filter of the MthK K<sup>+</sup> channel. *J. Gen. Physiol. 136*: 9-79
- Tietz N. W. (1987)** Fundamentals of Clinical Chemistry. Philadelphia 3.Auflage

- Towbin H., Steahelin T. und Gordon J. (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 76: 4350-4354
- Troughbian A. und Kobayashi H. (1999)** Kup is the major K<sup>+</sup> uptake system in *Escherichia coli* upon hyperosmotic stress at a low pH. *FEBS Lett.* 26: 144-148
- Varghese S., Wu A., Park S., Imlay K. R. und Imlay J. A. (2007)** Submicromolar hydrogen peroxide disrupts the ability of Fur protein to control free-iron levels in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 3: 822-30
- Weinand M., Krämer R. und Morbach S. (2007)** Characterization of compatible solute transporter multiplicity in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 701-8
- Whatmore A. M., Chudek J. A. und Reed R. H. (1990)** The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 136: 2527-2536
- Whatmore A. M. und Reed R. H. (1990)** Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K<sup>+</sup> in turgor regulation. *J. Gen. Microbiol.* 136: 2521-2526
- Wolf A., Krämer R. und Morbach S. (2003)** Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and their significance in response to osmotic stress. *Mol. Microbiol.* 49: 1119-1134
- Wood J. M. (1999)** Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 230-262
- Wood J. M. (2007)** Bacterial Osmosensing Transporters. *Methods Enzymol.* 478: 77-107
- Woodmansee A. N. und Imlay J. A. (2002)** Reduced flavins promote oxidative DNA damage in non-respiring *Escherichia coli* by delivering electrons to intracellular free iron. *J. Biol. Chem.* 37: 34055-66.
- Ye S., Li Y., Chen L. und Jiang Y. (2006)** Crystal structures of a ligand-free MthK gating ring: insights into the ligand gating mechanism of K<sup>+</sup> channels. *Cell* 6: 1161-73
- Yellen G. (1987)** Permeation in potassium channels: implications for channel structure. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 16: 227-46
- Zadek B. und Nimigean C. M. (2006)** Calcium-dependent gating of MthK, a prokaryotic potassium channel. *J. Gen. Physiol.* 127: 673-685
- Zhou Y., Morais-Cabral J. H., Kaufman A. und MacKinnon R. (2001)** Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414: 43-8

## Danksagung

---

### **Danke...**

...Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer für die Bereitstellung des spannenden Themas und dem regen Interesse am Fortschritt dieser Arbeit.

...Herrn Prof. Dr. Arnd Baumann für die freundliche Übernahme des Korreferats.

...Dr. Kay Marin für die außerordentlich gute Betreuung in den letzten Jahren. Danke für die vermittelte Lass-uns-reden Faszination an den Themen, stete Ruhe und unermüdlichen Optimismus, mit dem wir sogar Palmen an der schottischen Küste finden konnten!

...Prof. Dr. Ian R. Booth for the opportunity to do a half-year research stay in his laboratory at the IMS at the University of Aberdeen. Many thanks to all co-workers and a special thank to Dr. Michelle Edwards for guiding me in the lab.

... Herrn Prof. Dr. Olaf Pongs und seinen Mitarbeitern, Sönke Hornig, Martin Kruse, Iris Ohmert und Phanindra Velisetty am ZmnH Hamburg.

...Markus Becker für die stabile Kalium-Kiste und die zahlreichen konstruktiven Gespräche.

...Stephanie Huhn für unsere geteilte Zeit im Doppel und die Einsicht, dass alles gut wird!

...Martin Follmann für die guten Anleitungen und netten Gespräche.

...Elena Jolkver für das klein-aber-laut Sein im Labor.

...Eva Gleys, Dorothea Grzelak, Manfred Kreikler, Sabine Lohmer, Ute Meyer, Judith Pinger, Arthur Reuter, Gabi Sitek und Anja Wittmann für die technische Unterstützung.

... Dr. Markus Gierth für das Endkorrekturlesen der Arbeit.

...den Laborwelten, und nicht nur diesen, für ein hervorragendes Klima:

Suey van Baarle, Anna Bartsch, Michael Becker, Bettine Boltres, Kirsten Börngen, Marc Bramkamp, Andrea Brandt, Nathalie Brühl, Frank Bürmann, Julia Camps, Catriona Donovan, Anja Fleger-Weckmann, Alexander Henrich, Ilona Kalasová, Katja Kirsch, Carolin Lange, Stanislav Maksimov, Lorna Moll, Tobias Morbach, Jeannine Nettekoven, Sascha Nicklisch, Jens Novak, Vera Ott, Christos Pliotas, Jennifer Raaf, Tina Radespiel, Phillip Reihlen, Benjamin Roenneke, Juliane Röper, Astrid Schwaiger, Gerd Seibold, Boris Sieger, Andreas Uhde, Inga Wadenpohl und Turkan Yutserver.

...Akiko, Tim and Kai Rasmussen for our exciting Scottish Japanese-German time.

Ich danke herzlich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meinem Bruder René, für die unermüdliche Unterstützung!

### **Erklärung**

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

### **Teilpublikationen**

- 1) **M. Follmann, M. Becker, I. Ochrombel, V. Ott, R. Krämer and K. Marin (2009)** Potassium Transport in *Corynebacterium glutamicum* is facilitated by the putative channel protein CglK, which is essential for pH homeostasis and growth at acidic pH. *J. Bacteriol.* 191: 2944-52
- 2) **M. Follmann, I. Ochrombel, R. Krämer, C. Trötschel, A. Poetsch, C. Rückert, A. Hüser, M. Persicke, D. Seiferling, J. Kalinowski and K. Marin (2009)** Functional genomics of pH homeostasis in *Corynebacterium glutamicum* revealed novel links between pH response, oxidative stress, iron homeostasis and methionine synthesis. *BMC Genomics* 10: 621
- 3) **I. Ochrombel, L. Ott, R. Krämer, A. Burkovski and K. Marin (2011)** Impact of improved potassium accumulation on pH homeostasis, membrane potential adjustment and survival of *Corynebacterium glutamicum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1807: 444-50
- 4) **I. Ochrombel, M. Becker, R. Krämer and K. Marin (2011)** Osmotic stress response in *C. glutamicum*: impact of channel and transporter mediated potassium accumulation. *Arch. Microbiol.* (submitted)
- 5) **I. Ochrombel, M. D. Edwards, T. Rasmussen, R. Krämer, I. R. Booth and K. Marin (2011)** KTN domains mediate channel closure in a bacterial potassium channel, CglK, and regulate potassium accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (in Vorbereitung)

### **Vorträge**

- 1) **I. Ochrombel, M. Follmann, R. Krämer, C. Trötschel, A. Pötsch, C. Rückert, A. Hüser, M. Persicke, J. Kalinowski and K. Marin:**  
Functional genomics of pH homeostasis in *Corynebacterium glutamicum* revealed novel links between pH response, oxidative stress, iron homeostasis and methionine synthesis  
**Oral presentation OP88: 4th European Conference on Prokaryotic Genomics Göttingen, 04.-07.10.09**
- 2) **I. Ochrombel:**  
Potassium transport in *Corynebacterium glutamicum* is essential surviving osmotic stress  
**Workshop on Adaptation of microorganism to osmotic challenges, Marburg Max Planck Institute for Terrestrial Microbiology, 01-02.10.10**

## Erklärung

---

- 3) **I. Ochrombel:**  
Auswirkungen von pH- und CO<sub>2</sub>-Stress auf *Corynebacterium glutamicum* und Mechanismen der Stressantwort  
**Vortrag: SysMAP-Workshop, Siegen, 07.-08.04.08**
- 4) **I. Ochrombel:**  
pH homeostasis in *Corynebacterium glutamicum* from genomics to physiology  
**Vortrag: SysMAP-Workshop, Münster, 16-17.10.08**
- 5) **I. Ochrombel:**  
Functional genomics of pH homeostasis in *Corynebacterium glutamicum*  
**Vortrag: SysMAP-Workshop, CeBiTec Bielefeld, 30.-31.03.09**
- 6) **I. Ochrombel:**  
Beitrag von Ionen-Gradienten und Ionen-Flüssen zur Energiehomöostase in *Corynebacterium glutamicum*  
**Vortrag: SysEnCor-Workshop, Blaubeuren, 07.-08.11.10**

### Poster:

- 1) **I. Ochrombel, M. Follmann, R. Krämer, C. Trötschel, A. Poetsch, C. Rückert, A. Hüser, M. Persicke, J. Kalinowski and K. Marin**  
Comprehensive analysis of pH homeostasis in *Corynebacterium glutamicum* on the bioenergetic, transcriptome, as well as proteome level revealed a functional link between pH response, oxidative stress, iron homeostasis and methionine synthesis  
**Poster PR22: VAAM-Jahrestagung 2009 Bochum, 08.-11.03.09**
- 2) **I. Ochrombel, M. Follmann, M. Becker, V. Ott, P. Velisetty, R. Krämer and K. Marin**  
Potassium transport in *Corynebacterium glutamicum* is essential for surviving under osmotic stress conditions and is mediated by the channel protein CgIK  
**Poster: Gordon Research Conference, Cellular Osmoregulation and Mechanotransduction, University of New England Biddeford, ME, USA, 05.07-10.07.09**
- 3) **I. Ochrombel, M. Follmann, R. Krämer, C. Trötschel, A. Pötsch, C. Rückert, A. Hüser, M. Persicke, J. Kalinowski and K. Marin**  
Functional genomics of pH homeostasis in *Corynebacterium glutamicum* revealed novel links between pH response, oxidative stress, iron homeostasis and methionine synthesis  
**Poster P192: 4th European Conference on Prokaryotic Genomics Göttingen, 04.-07.10.09**
- 4) **C. Lange, I. Ochrombel, A. Henrich, D. Seiferling, R. Krämer and K. Marin**  
Analysis of oxidative Stress in *Corynebacterium glutamicum* and the impact of metal ion homeostasis.  
**Poster FTP06: VAAM-Jahrestagung 2010 Hannover, 28. - 31.03.10**
- 5) **I. Ochrombel, M. Follmann, R. Krämer, C. Trötschel, A. Pötsch, C. Rückert, A. Hüser, M. Persicke, J. Kalinowski and K. Marin**  
Functional genomics of pH homeostasis in *Corynebacterium glutamicum* revealed novel links between pH response, oxidative stress, iron homeostasis and methionine synthesis  
**Chemtogether@evonik, Marl: 17. -19. 11.10**

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

Datum:

Unterschrift:

