

**Biochemische und elektrophysiologische
Charakterisierung der dualen Funktion des Kanals
MscCG aus *Corynebacterium glutamicum***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Michael Becker

aus Bochum

Köln, 2013

Berichterstatter:

Prof. Dr. Reinhard Krämer

Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Juli 2013

Kurzzusammenfassung

In ihrer natürlichen Umgebung, sowie unter artifiziellen Bedingungen wie in der industriellen Biotechnologie sind Bakterien stetig Veränderungen ihrer Umwelt ausgesetzt. Um sich raschen Änderungen der externen Osmolalität anzupassen, besitzen Bakterien verschiedene Schutzmechanismen. Bei einem plötzlichen Abfall der externen Osmolalität wird eine Zellyse aufgrund einströmenden Wassers durch Aktivierung mechanosensitiver Kanäle verhindert. Dabei öffnen mechanosensitive Kanäle als Folge eines Anstiegs der Membranspannung und ermöglichen die rasche Freisetzung von kompatiblen Soluten. *Corynebacterium glutamicum* wird seit vielen Jahrzehnten für die Produktion von Aminosäuren wie L-Glutamat eingesetzt. Ein Exportmechanismus, der für die Freisetzung von Glutamat verantwortlich ist, war jedoch lange unbekannt. Vor wenigen Jahren wurde der Export von Glutamat mit dem mechanosensitiven Kanal MscCG in Verbindung gebracht. MscCG von *C. glutamicum* zählt zu den mechanosensitiven Kanälen der MscS-Familie und nimmt offenbar neben seiner Funktion als Notventil zur Freisetzung kompatibler Solute wie Glycin-Betain und Prolin auch eine Rolle bei der Produktion von Glutamat ein. So führt die Manipulation durch Verkürzung um 110 Aminosäuren zu einer spontanen Exkretion von Glutamat, während eine Deletion von *mscCG* eine ausgelöste Exkretion drastisch verringert. MscCG weist typische Eigenschaften eines Membranspannungs-abhängigen mechanosensitiven Kanals auf und ist zusammen mit dem sekundär aktiven Betain/Na⁺ Symporter BetP bei der Feinabstimmung der internen Solutkonzentration unter hyperosmotischen Bedingungen beteiligt. In dieser Arbeit wurde sowohl mit GOF- als auch LOF-Mutationen gezeigt, dass die Penicillin-ausgelöste Exkretion von Glutamat direkt durch den mechanosensitiven Kanal vermittelt wird. Die zusätzliche C-terminale Domäne von MscCG scheint dabei eine regulatorische, aber keine essenzielle Funktion einzunehmen, während die Integrität der vierten Transmembrandomäne, sowie flankierender Bereiche für die Akkumulation von Betain unter hyperosmotischen Bedingungen und damit der Osmoregulation als Antwort auf hyperosmotischen Stress von essenzieller Bedeutung ist.

Abstract

In their natural environment as well as under fermentation conditions in industrial biotechnology bacteria are exposed to rapid environmental changes. To cope with these changes, bacterial cells are equipped with several protective mechanisms to overcome life-threatening alterations, in particular against shifts in external osmolality. To prevent cell lysis caused by hypoosmotic downshift as a consequence of a massive influx of water, mechanosensitive channels are activated by an increased membrane tension to release compatible solutes. *Corynebacterium glutamicum* has been used for the industrial production of amino acids like L-glutamate since decades, whereas the export mechanism has only been poorly understood. Recently, the mechanosensitive channel MscCG was related to the production of glutamate. MscCG of *C. glutamicum* belongs to the MscS-family of mechanosensitive channels and plays, besides its function as emergency release for compatible solutes like glycine-betaine and proline, a role in the excretion of glutamate. The truncation of MscCG by 110 amino acids leads to spontaneous excretion of glutamate, whereas the deletion of *mScCG* results in a drastic decrease of the induced glutamate excretion. MscCG shows typical properties of stretch-activated mechanosensitive channels and contributes, together with the secondary active transporter BetP, to the adjustment of the internal concentration of compatible solutes which are accumulated during hypoosmotic conditions. This work provides evidence that glutamate is directly released through the channel domain of MscCG in response to penicillin treatment. GOF- as well as LOF-mutations were introduced in MscCG and enhanced or abolished the excretion of glutamate, respectively. The additional and unique C-terminal domain of MscCG seems to possess a regulatory function, without being essential for the triggered release of glutamate. However, the integrity of the fourth transmembrane domain, as well as enclosed and highly conserved segments surrounding this domain, are essential for the accurate accumulation of betaine during osmotic compensation after hypoosmotic shock.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 <i>Corynebacterium glutamicum</i>	1
1.2. Osmoregulation in <i>C. glutamicum</i> - Die Bewältigung von osmotischem Stress.....	2
1.2.1 Die hyperosmotische Stressantwort	2
1.2.2 Die hypoosmotische Stressantwort	5
1.3 Die Produktion von Glutamat mit <i>C. glutamicum</i>	8
1.4 MscCG von <i>C. glutamicum</i>	14
2. Material und Methoden	17
2.1 Bakterienstämme und Plasmide.....	17
2.2 Oligonukleotide	23
2.3 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	23
2.4 Molekularbiologie Methoden	24
2.4.1 Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> und Transformation.....	24
2.4.2 Herstellung transformationskompetenter <i>C. glutamicum</i> Zellen und Transformation.....	25
2.4.3 Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i>	26
2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA aus Agarosegelen	26
2.4.5 Polymerase-Kettenreaktion	27
2.4.6 Ortsgerichtete Mutagenese und Fusion von DNA-Fragmenten mittels PCR	28
2.4.7 Restriktion, Ligation und Sequenzierung von DNA	29
2.4.8 Konstruktion von Plasmiden	29
2.5 Proteinbiochemische Methoden.....	30
2.5.1 Zellaufschluss und Membranpräparation von <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i>	30
2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	30
2.5.3 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
2.5.4 Coomassie-Blau-Färbung von SDS-Gelen	31

2.5.5 Transfer, Immobilisierung und immunologische Detektion von Proteinen (Western-Blot)	32
2.5.6 Isolierung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie	33
2.6 Analytische Methoden	34
2.6.1 Bestimmung der Osmolalität von Lösungen.....	34
2.6.2 HPLC-Analyse	35
2.7 Biochemische Methoden	36
2.7.1 Betainaufnahme und -Efflux während osmotischer Kompensation	36
2.7.2 Bestimmung des Membranpotentials von <i>C. glutamicum</i>	37
2.7.3 Glutamatproduktion	38
2.7.4 Aufschluss von <i>C. glutamicum</i> durch Permeabilisierung	38
2.7.5 Bestimmung der Zellviabilität von <i>E. coli</i> nach hypoosmotischem Schock.....	38
2.8 Elektrophysiologische Messungen	39
2.8.1 Präparation von <i>E. coli</i> Sphäroplasten	39
2.8.2 <i>Patch-Clamp</i> -Messungen von <i>E. coli</i> -Sphäroplasten	41
2.8.3 <i>Patch-Clamp</i> -Messungen von Proteoliposomen.....	42
2.8.4 Bestimmung des Druckschwellenwerts von mechanosensitiven Kanälen	43
3. Ergebnisse	44
3.1 Untersuchungen zur Funktion von MscCG in der Glutamatexkretion.....	44
3.1.1 Konstruktion von GOF- und LOF-Mutanten von MscCG.....	44
3.1.2 Charakterisierung von GOF- und LOF Mutationen in MscCG	49
3.2 Untersuchungen zur Rolle der C-terminalen Domäne von MscCG	58
3.2.1 Einfluss C-terminaler Verkürzungen von MscCG.....	59
3.2.2 Untersuchung zur Rolle der C-terminalen Domäne mit MscS-Fusionskonstrukten	76
3.2.3 Einfluss konservierter Bereiche der C-terminalen Domäne von MscCG	84
4. Diskussion.....	97

4.1 Die Funktion von MscCG in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	97
4.2 Die Exkretion von Glutamat wird von MscCG vermittelt.....	98
4.3 Die Integrität der C-terminalen Domäne ist für eine spontane Exkretion von Glutamat notwendig	105
4.3.1 Der Einfluss der C-terminalen Domäne unter Berücksichtigung von MscCG Δ 110	108
4.3.2 Bedeutung konservierter Regionen für den Einfluss der C-terminalen Domäne.	109
4.4 Einfluss der C-terminalen Domäne auf MscS	110
4.5 Die Bedeutung der C-terminalen Domäne für die Aufnahme kompatibler Solute unter hyperosmotischen Bedingungen	113
4.6 Modell zur Exkretion von Glutamat und einer Doppelfunktion der C-terminalen Domäne.....	114
5. Zusammenfassung	120
6. Literaturverzeichnis.....	122
7. Anhang	137

Abkürzungsverzeichnis

Am ^R	Ampicillin-Resistenz
AS	Aminosäure(n)
ATCC	American Type Culture Collection
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
cpm	Anzahl pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DDM	<i>n</i> -Dodecyl β -D-Maltosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GOF	Funktionsgewinn (<i>gain of function</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Km ^R	Kanamycin-Resistenz
LB	Luria-Bertani (<i>lysogeny broth</i>)
LOF	Funktionsverlust (<i>loss of function</i>)
LPC	Lysophosphatidylcholin
NBT	p-Nitrotetrazoliumblauschlorid
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

Abkürzungsverzeichnis

PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TM	Transmembrandomäne
TPP	Tetraphenylphosphoniumbromid
ZTM	Zelltrockenmasse

Des Weiteren wurden die üblichen Abkürzungen des Internationalen Einheitensystems (système international d'unités, SI) verwendet.

1. Einleitung

1.1 *Corynebacterium glutamicum*

Seit seiner Isolierung aus einer Bodenprobe, auf der Suche nach Aminosäure-produzierenden Bakterien (Abe *et al.*, 1967; Kinoshita *et al.*, 1957) gilt das Gram-positive und apathogene *Corynebacterium glutamicum* seit Jahrzehnten als einer der bedeutendsten Mikroorganismen in der industriellen Biotechnologie. *C. glutamicum* ist ein stäbchenförmiges, unbewegliches und Biotin-auxotrophes Bodenbakterium und zählt mit seinen pathogenen Verwandten wie *C. diphtheriae* und *Mycobacterium tuberculosis* zu den Mycolsäure-haltigen Actinomyceten. Bakterien dieser Ordnung zeichnen sich durch einen hohen G/C-Gehalt ihrer DNA aus und besitzen einen einzigartigen Zellwandaufbau (Stackebrandt *et al.*, 1997). Als apathogenes Bakterium dient *C. glutamicum* aufgrund seines speziellen Zellwandaufbaus als Modellorganismus u.a. für *C. diphtheriae* und *M. leprae*. So stellt die Mycolsäure-haltige, äußere Schicht der Zellwand eine Barriere für Antibiotika und andere hydrophile Substanzen dar (Jarlier und Nikaido, 1994; Jarlier und Nikaido, 1990). Dabei scheinen die Mycolsäuren der äußeren Schicht für die Permeabilitätsbarriere essenziell zu sein (Gebhardt *et al.*, 2007; Tropis *et al.*, 2005).

C. glutamicum nimmt als einer der Hauptproduzenten von Aminosäuren wie L-Lysin und L-Glutamat eine große wirtschaftliche Bedeutung in der industriellen Biotechnologie ein. So liegt die weltweite Produktion von L-Lysin, das als Futtermitteladditiv verwendet wird, bei ca. 1,5 Mio. Tonnen/Jahr, während die Produktion des Geschmackverstärkers L-Glutamat ca. 2,5 Mio. Tonnen beträgt (Becker und Wittmann, 2012). Aufgrund seiner wirtschaftlichen Bedeutung zur Herstellung von Aminosäuren und anderen biotechnologisch relevanten Metaboliten wie organische Säuren und Vitamine (Vertès *et al.*, 2012), wurde 2003 das Genom von *C. glutamicum* ATCC 13032 mit 3,3 Mb von mehreren Gruppen vollständig sequenziert (Ikeda und Nakagawa, 2003; Kalinowski *et al.*, 2003). Mithilfe der erlangten Daten wurden 3002 Protein-kodierende Gene vorhergesagt, von denen 22% als für die Kodierung von integralen Membranproteinen verantwortlich angesehen werden. Aufgrund seiner biotechnologischen und damit wirtschaftlichen Bedeutung, ist *C. glutamicum* seitdem Gegenstand intensiver Forschung zur Produktionsoptimierung. Ziel sind dabei insbesondere Manipulationen des Metabolismus, sowie die Identifizierung und Charakterisierung von Aufnahme- und Exportmechanismen.

1.2. Osmoregulation in *C. glutamicum* - Die Bewältigung von osmotischem Stress

Bakterien sind jederzeit Veränderungen ihrer Umgebung ausgesetzt. So ist *C. glutamicum* in seinem natürlichen Habitat, aber auch unter Fermentationsbedingungen mit Schwankungen des pH, der Temperatur und insbesondere der externen Osmolalität konfrontiert. Drastische Änderungen der externen Osmolalität, die beispielsweise durch Regen oder Trockenheit hervorgerufen werden, können zur einer Lyse oder Dehydrierung der Zellen führen. *C. glutamicum* besitzt diverse Mechanismen zur Osmoregulation, um hypoosmotische und hyperosmotische Änderungen der externen Osmolalität zu kompensieren. Eine Komponente zur Aufrechterhaltung des Turgors, der für die Wachstum und Zellteilung essenziell ist, stellt die Zellwand dar (Koch, 1984). Der Zellturgor resultiert durch Einströmen von Wasser entlang des chemischen Potentials aufgrund hoher Konzentration von osmotisch wirksamen Teilchen in der Zelle. Der Turgor wird dabei durch Ausbildung eines hydrostatischen Drucks auf die Cytoplasmamembran und Zellwand hervorgerufen. Um den Zellturgor aufrecht zu erhalten, werden osmotisch wirksame Solute zu denen Aminosäuren, Oligosaccharide und Aminosäurederivate zählen, gegen den chemischen Gradienten akkumuliert (Epstein, 1986). Die Akkumulation kompatibler Solute erfolgt hauptsächlich unter hyperosmotischen Bedingungen um den osmotischen Gradienten durch einströmendes Wasser durch Erhöhung der internen Osmolalität aufrecht zu halten, ohne dabei Zellfunktionen trotz hoher Konzentration zu beeinflussen und Proteine durch präferierte Hydratisierung sogar zu stabilisieren (Csonka und Epstein, 1996; Poolman und Glaasker, 1998; Ruffert *et al.*, 1997).

1.2.1 Die hyperosmotische Stressantwort

Eine plötzliche hyperosmotische Veränderung der externen Osmolalität hat zunächst ein passives Ausströmen von Wasser via Aquaporine zur Folge. Dies ist gefolgt von einer Rehydrierung des Cytoplasmas und Akkumulation von Ionen sowie kompatiblen Soluten. Nach dieser Phase werden ionische Osmolyte vermehrt gegen kompatible Solute ausgetauscht und das Zellwachstum fortgesetzt (Dinnbier *et al.*, 1988; Wood, 1999). Von *C. glutamicum* werden bevorzugt K^+ -Ionen, sowie die kompatiblen Solute Glycin-Betain, Prolin, Glutamat, Ectoine und Trehalose akkumuliert (Farwick *et al.*, 1995; Frings *et al.*, 1993; Guillouet und Engasser, 1995a, 1995b). Zur Akkumulation von kompatiblen Soluten erfolgt neben der Aufnahme außerdem die Biosynthese von Glutamat, Prolin und Trehalose

(Kawahara *et al.*, 1989; Skjerdal *et al.*, 1996; Wolf *et al.*, 2003). Die Neusynthese von Soluten ist dabei abhängig von externen Bedingungen, wie beispielsweise der Stickstoff-Verfügbarkeit (Morbach, 2005). Eine Aufnahme wird gegenüber der Neusynthese aufgrund geringerer Energiekosten favorisiert. Zur Aufnahme von kompatiblen Soluten besitzt *C. glutamicum* die osmoregulierten sekundär aktiven Transporter BetP, ProP, LcoP und EctP (Peter *et al.*, 1996; Peter *et al.*, 1998; Steger *et al.*, 2004) sowie PutP (Peter *et al.*, 1997). Die Aktivität der Transporter ist in Abhängigkeit der extern Osmolalität in ähnlicher Weise reguliert (Morbach und Krämer, 2003).

Zusätzlich besitzt *C. glutamicum* Systeme, die Veränderungen wahrnehmen und Signale beispielsweise zur Expressionsänderung weiterleiten können (Kočan *et al.*, 2006). Ein System, das bei Osmostress zutragen kommt ist MtrAB (Möker *et al.*, 2004). MtrAB ist ein osmosensorisches Zweikomponentensystem, das aus der membranständigen Histidin-Kinase MtrB und dem löslichen Response-Regulator MtrA, der als Transkriptionsfaktor agiert, besteht. MtrB ist in der Lage einen Osmostimulus, ausgehend vom cytoplasmatischen Raum, zu perzipieren, wobei die Proteinkinase an einem Histidinrest autophosphoryliert und die Phosphoryl-Gruppe an einem Aspartat des Response-Regulators transferiert wird. Die dabei veränderte Fähigkeit DNA zu binden, führt zur Aktivierung oder Unterdrückung der Transkription bestimmter Gene. So reguliert MtrAB unter anderem die Expression von *proP*, *lcoP* und *betP* (Brockner und Bott, 2006).

Einer der bestuntersuchten sekundären Transporter ist BetP, dessen Struktur mit einer Auflösung von 3,3 Å seit einigen Jahren bekannt ist (Ressl *et al.*, 2009). BetP ist ein Na⁺-gekoppelter Symporter. Er gehört zu der Familie der Betain/Cholin/Carnitin-Transporter (BCCT) und ist für die hochaffine Aufnahme von Glycin-Betain verantwortlich (Rübenhagen *et al.*, 2000). BetP besteht aus 594 Aminosäuren, die eine Kerndomäne aus 12 Transmembransegmenten bilden, sowie zwei C- sowie N-terminale, hydrophile Domänen die mit ca. 55 Aminosäuren im Cytoplasma lokalisiert sind. Die Aufnahme von Betain ist gekoppelt mit dem Symport von zwei Na⁺-Ionen zum Aufbau eines Betain-Gradienten bis zu einem Innen/Außen-Verhältnis von $4 \cdot 10^6$, bei einem K_m von 8,9 µM (Farwick *et al.*, 1995). BetP ist stark osmoreguliert und erreicht seine maximale Aktivität bei einer Osmolalität von ca. 1,3 osmol/kg (Peter *et al.*, 1996). Die Osmostimulierung von BetP ist nicht restlos verstanden und unterliegt sowohl intrinsischen, als auch externen Faktoren. In einem Proteoliposomensystem konnten Faktoren, die zur Stimulierung von BetP beitragen, identifiziert werden. So wird die Aktivität von BetP in Anwesenheit von K⁺-Ionen mit einer Konzentration von über 200 mM signifikant stimuliert (Rübenhagen *et al.*, 2001). Ein

weiterer Faktor zur Stimulierung von BetP ist die Oberflächenladung der umgebenden Lipiddoppelschicht in *C. glutamicum*, wobei die negative Ladung der Phospholipide die Aktivierung von BetP deutlich beeinflusst (Schiller *et al.*, 2006). Außerdem scheint die Aktivierung von BetP durch die hydrophile C-terminale Domäne beeinflusst zu sein. Die Verkürzung um 23 Aminosäuren resultiert in einer verringerten Maximalaktivität und dem Verlust der Regulation. Die vollständige Deletion dieser Domäne führt sogar zu einer Inaktivierung von BetP (Schiller *et al.*, 2004b). Die C-terminale Domäne wird demnach als eine Sensordomäne angesehen, die eine essenzielle Rolle in der Reizwahrnehmung von BetP besitzt (Schiller *et al.*, 2004a) und eine inhibierende Funktion einnehmen kann. Es wird angenommen, dass die C-terminale Domäne mit der Membranoberfläche interagiert und somit BetP inaktiviert (Ott *et al.*, 2008).

Die Adaption von BetP während der Kompensation von osmotischem Stress unterliegt mehr als nur der Aktivierung und Deaktivierung von BetP. So ist auch die Regulation während und nach der osmotischen Kompensation von Bedeutung. Es wurde beobachtet, dass die Aktivität von BetP ist nach Akkumulation von Betain deutlich verringert ist (Botzenhardt *et al.*, 2004). Diese verringerte Aktivität wird jedoch nicht auf die interne Konzentration akkumulierter kompatibler Solute oder der Kaliumkonzentration zurückgeführt. Es wird vermutet, dass ein zusätzlicher Stimulus nach Anpassung des osmotischen Gradienten regulierend wirkt und möglicherweise von BetP durch Veränderungen des Membranzustands durch Protein/Lipid-Interaktionen wahrgenommen wird. Tatsächlich erfolgt die Feinabstimmung der internen Betainkonzentration unter hyperosmotischen Bedingungen im Zusammenspiel mit dem mechanosensitiven Kanal MscCG. So wurde gezeigt, dass die Abstimmung der internen Solutkonzentration nicht nur durch die aktive Aufnahme des sekundären Transporters BetP reguliert wird, sondern auch passiv durch den bei hypoosmotischen Stress aktivierten mechanosensitiven Kanal (Börngen *et al.*, 2010).

1.2.2 Die hypoosmotische Stressantwort

Eine hypoosmotische Veränderung der Umgebung führt zu einem Wassereinstrom in die Bakterienzelle und resultiert in einem Anstieg des Zellurgors. Um eine Zellyse zu vermeiden, besitzen Bakterien einen Schutzmechanismus, der in der Lage ist das osmotische Ungleichgewicht auszugleichen (Abb. 1). Als Antwort auf die steigende Membranspannung werden mechanosensitive Kanäle aktiviert, die durch Öffnung ihrer Pore akkumulierte kompatible Solute und Ionen freisetzen und so den osmotischen Gradienten verringern und damit das Einströmen von Wasser unterbinden (Levina *et al.*, 1999; Martinac *et al.*, 1987; Sukharev *et al.*, 1994).

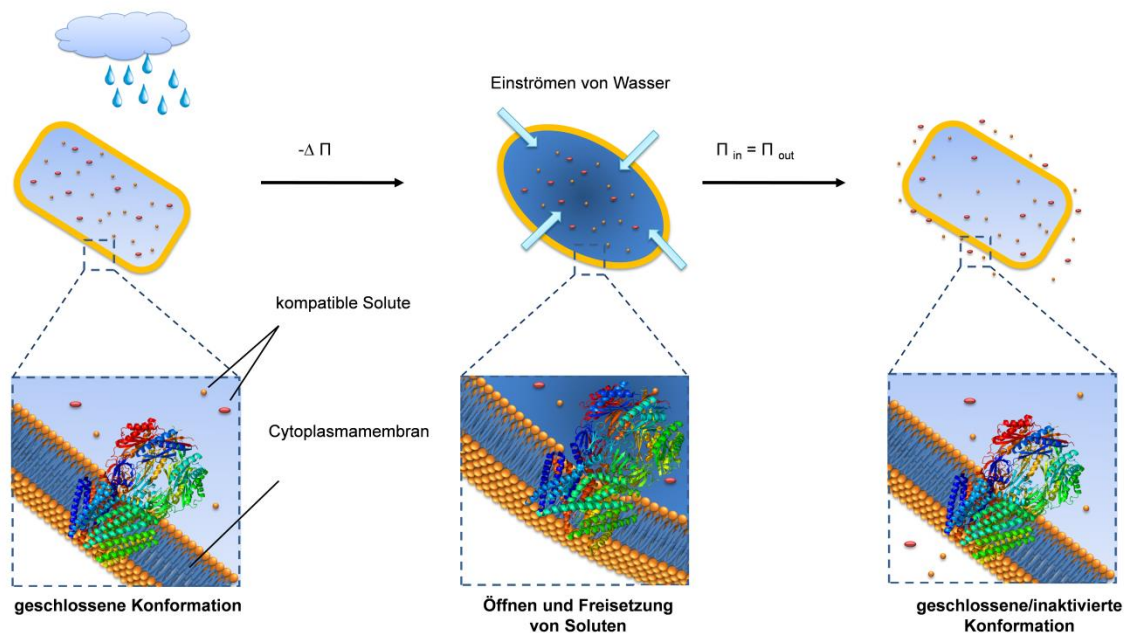


Abb. 1: Schematische Darstellung der Freisetzung von kompatiblen Soluten durch mechanosensitive Kanäle nach hypoosmotischem Schock. Eine plötzliche Verringerung der externen Osmolalität führt zu einem Einströmen von Wasser in die Bakterienzelle. Um eine Zellyse zu vermeiden und den osmotischen Gradienten zu verringern, werden durch die Membranspannung mechanosensitive Kanäle aktiviert und kompatible Solute und Ionen freigesetzt. Dargestellt ist die geschlossene (Bass *et al.*, 2002), als auch die offene Konformation von MscS (Wang *et al.*, 2008) aus *E. coli*.

Dieser Aktivierungsmechanismus ist gut, wenn auch nicht in allen Details verstanden. Als sicher gilt, dass Veränderungen der Lipiddoppelschicht wahrgenommen werden und mechanische Kräfte zu Strukturänderungen führen. Die ersten bakteriellen mechanosensitiven Kanäle wurden in *E. coli* identifiziert und elektrophysiologisch charakterisiert. Diese unterscheiden sich in ihrer Leitfähigkeit und werden demnach benannt. So weist MscS (*mechanosensitive channel of small conductance*) eine kleine, MscL eine hohe (*large*) und MscM die kleinste (*mini*) Leitfähigkeit in *E. coli* auf. Zusätzlich ist der Kalium-abhängige Kanal MscK beschrieben (Berrier *et al.*, 1996; Levina *et al.*, 1999). Im

Gegensatz zu MscS und MscL ist die Regulation und die Funktion von MscM noch völlig unverstanden. MscL wurde intensiv charakterisiert und seine Struktur aus *Mycobacterium tuberculosis* in einer geschlossenen Konformation mit einer Auflösung von 3,5 Å (Chang *et al.*, 1998), sowie einer expandierten Konformation aus *Staphylococcus aureus* mit einer Auflösung von 3,8 Å (Liu *et al.*, 2009) identifiziert. MscL ist der größte bekannte mechanosensitive Kanal mit einer Leitfähigkeit von über 3 nS und wird erst kurz vor Zellyse bei massiver Membranspannung aktiviert (Sukharev *et al.*, 1994). MscL wird als Homopentamer assembliert, von dem jedes Monomer aus zwei Transmembransegmenten und 136 Aminosäuren besteht, wobei C- sowie N-terminus im Cytoplasma lokalisiert sind und eine Pore von 30 Å bilden können. Die erste und zweite Transmembrandomäne sind im Periplasma mit einem flexiblen *loop* verbunden. MscL ist hoch konserviert, in nahezu jedem Bakterium zu finden und wird als *ultima ratio* einen hypoosmotischen Schock zu kompensieren aktiviert (Nakamaru *et al.*, 1999). MscS von *E. coli* ist der erste bakterielle mechanosensitive Kanal, der elektrophysiologisch identifiziert wurde. MscS besteht aus 286 Aminosäuren, die einen homoheptameren Komplex bilden, deren mutmaßlich offene, als auch geschlossene Konformation identifiziert wurde (Bass *et al.*, 2002; Pliotas *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2008). Jedes Monomer besitzt eine stark konservierte Kanaldomäne, die aus drei Transmembrandomänen (TM1: AS 28-60; TM2: AS 63-90; TM3a: AS 93-113 und TM3b: AS 113-128) gebildet wird, sowie einer C-terminalen cytoplasmatischen Domäne (Abb. 2). Die erste Transmembrandomäne ist mit der zweiten Transmembrandomäne durch einen engen Knick verbunden, die wiederum über einen *loop* mit TM3b verbunden ist. Die dritte Transmembrandomäne ist aufgrund eines Knicks bei Gly113 leicht gebogen und wird daher in die TM3a und TM3b unterteilt. Diese bildet mit einem Durchmesser von 7-11 Å in der heptameren Konformation die Pore des Kanals (Bass *et al.*, 2002; Sotomayor und Schulten, 2004). Jede der helikalen Achsen von TM1 und TM3 verlaufen nahezu parallel, wohingegen TM2 antiparallel verläuft. Die periplasmatische Domäne besteht hauptsächlich aus β -Faltblättern, sowie kompakten α -Helices. Seitlich der periplasmatischen Domäne sind sieben Öffnungen mit einem Durchmesser von 12 Å, die den Transfer von Ionen durch die Pore ermöglichen. Die schmalste Stelle der Pore ist von hydrophoben Aminosäuren gesäumt (Leu105 und Leu109), die den Kanal in geschlossener Konformation abdichten und für eine geschlossene Konformation benötigt werden (Bass *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2003b). Die Poren-formende Domäne besitzt ein Glycin-Alanin-reiches Motiv (93-AxxGAAGxAxGxAxyG-113, mit x: hydrophob, y: hydrophil), das für eine Art Helix-Helix-Verknüpfung innerhalb der dritten Domäne verantwortlich ist. Dieses Motiv erlaubt eine

Verschiebung gegenüberliegender TM3-Helices und damit die Öffnung der Pore (Edwards *et al.*, 2005). In der geöffneten Konformation passen TM1 und TM2 eine Veränderung Cytoplasmamembran infolge von erhöhter Membranspannung durch Drehung an, die dann zu einer Konformationsänderung der dritten Transmembrandomäne und einem Auseinanderziehen der hydrophoben Seitenketten von Leu105 und Leu109 führt (Wang *et al.*, 2008). Manipulationen der dritten Transmembrandomäne durch Substitution von Alaninen oder Glycinen führen zu einem erleichterten *gating*-Verhalten und äußern sich unter anderem in veränderten Leitfähigkeiten und verringerter Viabilität der Zellen (Edwards *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2003a; Okada *et al.*, 2002). In neuen Modellen wird außerdem angenommen, dass die dritte Transmembrandomäne ihren Knick bei Gly113 in geschlossener Konformation verliert und eine verlängerte TM3a mit einem Knick bei Gly121 bildet (Akitake *et al.*, 2007). Die Öffnung der Pore wird demnach als Folge der Bewegung bei Gly121 angesehen die durch Weiterleitung von Änderungen der Membranspannungen durch eine Art Klammer bei Leu113 und Phe68 vermittelt wird (Belyy *et al.*, 2010). Bis heute werden immer neue Homologe mit zusätzlichen N- oder C-terminalen Domänen identifiziert, deren Aminosäuresequenz insbesondere in der Poreformenden dritten Transmembrandomäne stark konserviert ist (Caldwell *et al.*, 2010; Levina *et al.*, 1999; Schumann *et al.*, 2010).

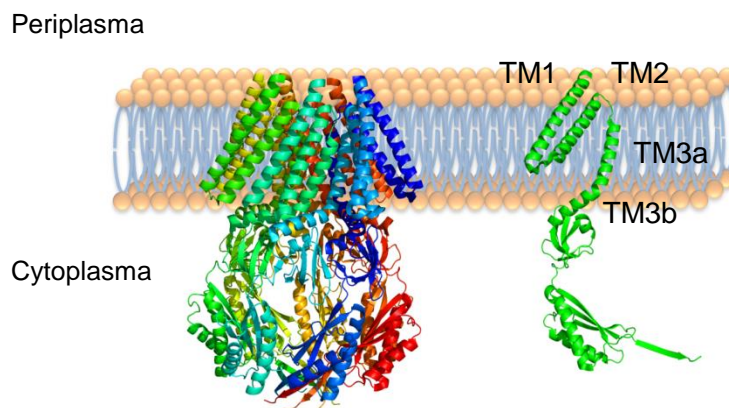


Abb. 2: Darstellung der geschlossenen Struktur von MscS aus *E. coli*. MscS bildet ein Heptamer in der Cytoplasmamembran von *E. coli* (links). Jedes Monomer (rechts) besteht aus drei Transmembrandomänen, von denen die dritte Transmembrandomäne die Pore des mechanosensitiven Kanals bildet. Der Hauptteil des Kanals bildet der cytoplasmatische Anteil mit insgesamt sieben Seitenöffnungen (Bass *et al.*, 2002, 2OAU.pdb).

Die *E. coli* Kanäle MscS und MscL sind trotz leichter Tendenz zur Freisetzung von Anionen im Falle von MscS relativ unspezifisch (Edwards *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu weist *C. glutamicum* mit der Freisetzung von hauptsächlich Betain und Prolin eine größere Substratspezifität auf (Ruffert *et al.*, 1997). In *C. glutamicum* wurden bisher zwei mechanosensitive Kanäle identifiziert (Ruffert *et al.*, 1999), von denen ein Kanal homolog zu MscL von *E. coli* ist, sowie ein Kanal, der zu der MscS-Familie zählt. Beide Kanäle wurden hinsichtlich ihrer Rolle zur Freisetzung von kompatiblen Soluten nach hypoosmotischem Schock untersucht und charakterisiert. Die Deletion des MscL-Homologs hat keinen Effekt auf die Zellviabilität oder Freisetzung von Soluten, wobei die Deletion des MscS-Homologs hingegen die Freisetzung von Betain und die Fähigkeit hypoomotische Schocks zu kompensieren reduziert. Trotzdem wird die Existenz eines weiteren, unbekanntes Effluxkanals angenommen. So waren Zellen trotz Doppeldeletion beider mechanosensitiven Kanäle in der Lage hypoosmotische Schocks zu überleben (Nottebrock *et al.*, 2003).

1.3 Die Produktion von Glutamat mit *C. glutamicum*

C. glutamicum wird seit über 50 Jahren für die Produktion von Aminosäuren verwendet. Noch heute ist *C. glutamicum* einer der wichtigsten Organismen zur Herstellung von L-Glutaminsäure in Form des Geschmackverstärkers Mononatrium-Glutamat (MSG), der die fünfte Geschmacksqualität umami hervorruft. L-Glutamat besitzt den größten Anteil biotechnologisch hergestellter Aminosäuren (Becker und Wittmann, 2012). Die fermentative Herstellung von L-Glutamat erfolgt unter sterilen Bedingungen hauptsächlich mit Melasse von Zuckerrüben als Kohlenstoffquelle, sowie Stickstoff-, Schwefel-, Phosphorquellen und Spurenelementen. Die Fermentation erfolgt unter spezifischen pH-, Temperatur- und Belüftungsbedingungen in industriellen *large-scale* Fermentern. Die Gewinnung des L-Glutamats im Medium erfolgt mittels Kristallisation durch Anpassung des pH-Werts an dessen isoelektrischen Punkt von 3,2 (Kimura, 2005; Leuchtenberger *et al.*, 2005).

C. glutamicum benötigt als Biotin-auxotrophes Bakterium Biotin (Vitamin B7) für sein Wachstum. Bei ausreichender Anwesenheit von Biotin setzt *C. glutamicum* kein Glutamat frei. Eine Limitierung von Biotin führt jedoch zu einer Exkretion von Glutamat (Shiio *et al.*, 1962). Neben der Limitierung von Biotin, gibt es weitere Möglichkeiten, eine Exkretion von

Glutamat hervorzurufen. So ermöglichen die Zugabe der Detergenzien Tween 40 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monopalmitat) und Tween 60 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monostearat) (Takinami *et al.*, 1964), aber auch Ethambutol (Radmacher *et al.*, 2005) oder die Zugabe des β -Lactam-Antibiotikums Penicillin (Nara *et al.*, 1964) eine Exkretion von Glutamat. Auch Anästhetika wie Chlorpromazin, Tetracain, Butacaine oder Benzocaine lösen eine Exkretion von Glutamat aus (Lambert *et al.*, 1995). Sämtliche Behandlungen beeinflussen die Cytoplasmamembran oder Struktur der Peptidoglycanschicht sowie die äußere Mycolsäureschicht. So wird Biotin als Coenzym für die Fettsäuresynthese benötigt, was bei Biotin-Limitierung zu einer verringerten Verfügbarkeit von Phospholipiden führt und damit in Veränderungen der Membran resultiert. Die Zugabe von β -Lactam-Antibiotika wie Penicillin G beeinflusst die Zellwandsynthese durch Bindung von Penicillin-Bindeproteinen die eine Transglykolisierung und Transpeptidierung von Peptidoglycan vermitteln (Nunheimer *et al.*, 1970). Ethambutol beeinflusst die Arabinosyltransferase-Aktivität und somit den Aufbau der Arabinogalactanschicht (Belanger *et al.*, 1996), wohingegen Lokalanästhetika den physikalischen Zustand von Lipiddoppelschichten direkt verändern (Cantor, 1997).

Die Cytoplasmamembran, bestehend aus hauptsächlich negativ geladenen Phospholipiden, ist bei *C. glutamicum* von einer kovalent gebundenen Peptidoglycan- und Arabinogalactanschicht umgeben. Darüber befindet sich eine Mycolatschicht, hauptsächlich aus Dimycolaten bestehend, die mit der darunter liegenden Arabinogalactanschicht verestert sind. Einige der Arabinosylenden sind mit darüber liegenden Mycolsäuren verestert und bilden so einen Mycolyl-Arabinogalactan-Peptidoglycan-Komplex. Diese äußere Schicht beinhaltet Mycolsäuren unterschiedlicher Länge. *C. glutamicum* besitzt im Vergleich zu anderen Mycobacterien kürzere Mycolsäuren. Diese Schicht bildet insgesamt eine deutliche Permeabilitätsbarriere, die eine Rolle sowohl bei der Antibiotikaresistenz als auch der Glutamat-Produktion einnimmt (Burkovski, 2013; Eggeling und Sahm, 2001; Puech *et al.*, 2001).

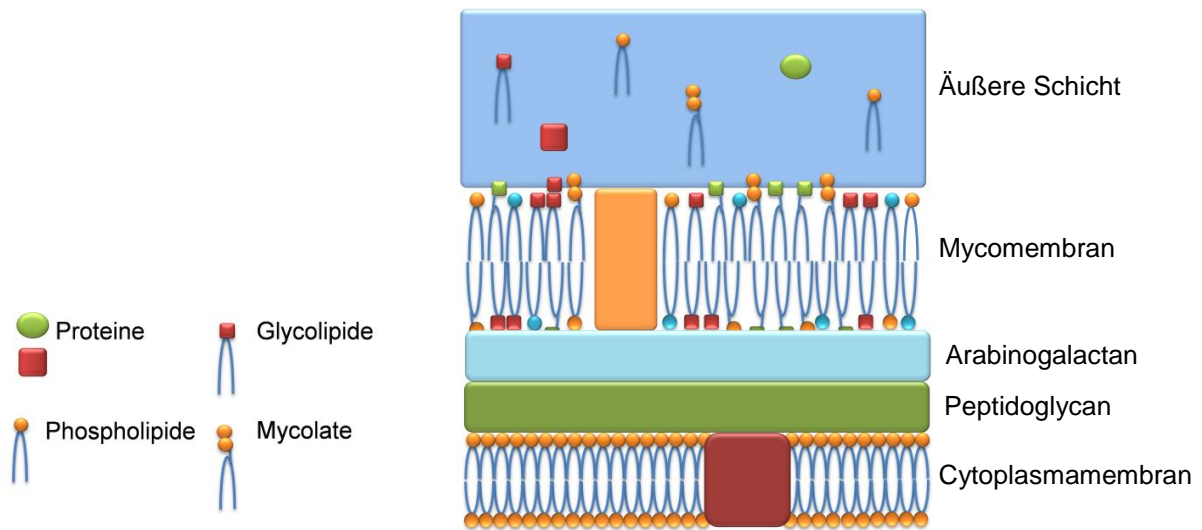


Abb. 3: Schematische Darstellung der Zellhülle von *Corynebacterium glutamicum*. Oberhalb der Cytoplasmamembran befindet sich eine Peptidoglycanschicht, die mit einer Arabinogalactanschicht kovalent verbunden ist. Einige der Arabinosylenden sind mit darüber liegenden Mycolsäuren verestert und bilden zusammen einen Mycolyl-Arabinogalactan-Peptidoglycan-Komplex. Über dieser Schicht erstreckt sich eine äußere Schicht, die lösliche Mycolate in Form von Trehalosemonomycolaten und Trehalosedimycolaten sowie Proteine bzw. Glycoproteine enthält. (modifiziert nach Burkovski, 2013).

Auch passive Veränderungen der Zellwand, durch genetische Veränderung von Stoffwechselwegen zur Synthese von Fettsäuren, führen zu einer Exkretion von Glutamat. Die Deletion von Genen, die für die Synthese von Trehalose notwendig sind haben einen Verlust der Mycolatschicht aufgrund fehlender Trehalosemono- und dimycolate zur Folge (Tropis *et al.*, 2005). Dieser Verlust führt zur Glutamatexkretion, die auch bei Deletion oder Überexpression von Proteinen auftritt, die an der Lipidsynthese beteiligt sind und eine Veränderung der Lipidzusammensetzung hervorrufen (Gebhardt *et al.*, 2007; Nampoothiri *et al.*, 2002). Die Identifikation eines Stamms, der nicht sensitiv gegenüber Tween 40 war, führte zur Identifikation des Gens *dtsR1*, das eine große Ähnlichkeit zu der β -Untereinheit einer Propionyl-CoA-Carboxylase anderer Bakterien aufweist und ein Bestandteil des Biotin-beinhaltenden Fettsäurebiosynthese-Komplexes AccBC-DtsR1 ist (Kimura *et al.*, 1996). In Anwesenheit von Biotin war die *dtsR1* Deletionsmutante in der Lage Glutamat zu produzieren (Kimura *et al.*, 1997). Bei Biotin-limitierten Bedingungen und nach Zugabe von Tween 40 war die Menge an DtsR1 erhöht, wobei Penicillin keine Veränderung der Proteinmenge hervorrief. Somit hat Tween 40 wahrscheinlich einen direkten Einfluss auf den Acetyl-CoA-Carboxylase-Komplex und inhibiert somit die Fettsäuresynthese (Kimura *et al.*, 1999). In *C. glutamicum* wurden zwei Carboxylasen identifiziert, die mit DtsR1 einen

Komplex bilden, Biotin als Cofaktor verwenden und damit für die Fettsäure- sowie Mycolsäuresynthese essenziell sind (Gande *et al.*, 2007).

Entscheidend für die Exkretion von Glutamat ist nicht nur die Änderung der Zellhülle, sondern auch Modifikationen des Metabolismus. So wurde eine verringerte Aktivität des ODHC (2-Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplex) unter Glutamat-Produktionsbedingungen, nach Zugabe von Tween 40 oder Penicillin, sowie unter Biotin-Limitierung beobachtet (Kawahara *et al.*, 1997). Auch die Deletion von *dtsRI* resultierte in einer Verringerung der ODHC-Aktivität (Kimura, 2002). Der ODHC ist im Citratzyklus für die oxidative Decarboxylierung von 2-Oxoglutarat, dem Vorprodukt zur Synthese von Glutamat, zu Succinyl-CoA verantwortlich. Während unter Produktionsbedingungen eine verringerte Aktivität des ODHC beobachtet wurde, war die Aktivität der Glutamatdehydrogenase (GDH), die für die Katalyse von 2-Oxoglutarat zu Glutamat verantwortlich ist, unverändert. Dennoch scheint die ODHC-Aktivität mit der Produktion von Glutamat negativ zu korrelieren (Kawahara *et al.*, 1997). So führte die Deletion des Gens *odhA*, das für die 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase-Untereinheit E1o des ODHC kodiert, zu einer Produktion von Glutamat (Asakura *et al.*, 2007). Eine verringerte ODHC-Aktivität und somit eine Verschiebung des metabolischen Flusses in Richtung der Synthese von Glutamat ist demnach entscheidend. Die Regulation der ODHC-Aktivität war allerdings bis zur Identifikation des Regulatorproteins OdhI unbekannt. OdhI ist ein 15 kDa großes Protein, das als Substrat der Serin/Threonin-Kinase PknG fungiert. OdhI besitzt eine FHA Domäne (*forkhead-associated domain*), die an Phosphothreonin-Epitopen von Proteinen bindet und die Interaktion mit anderen Proteinen vermittelt. In seiner unphosphorylierten Form inhibiert OdhI den ODHC durch direkte Interaktion mit der E1o Untereinheit von OdhA. PknG phosphoryliert die Threoninreste von Thr14 und Thr15 und die Bindung wird verhindert (Niebisch *et al.*, 2006). Außerdem wurden die Proteinkinasen PknA, PknB und PknL identifiziert die in der Lage sind OdhI zu phosphorylieren (Schultz *et al.*, 2009). Die phosphorylierte Form von OdhI wird von der Phosphatase Ppp dephosphoryliert, was die Inaktivierung des ODHC zur Folge hat (Schultz *et al.*, 2007). Dabei interagiert der Phosphothreoninrest von OdhI mit seiner eigenen FHA-Domäne und kann nicht mit OdhA interagieren, um die ODHC-Aktivität zu inhibieren. Die FHA-Domäne in der unphosphorylierten Form von OdhI interagiert dabei mit der C-terminalen Dehydrogenase Domäne von OdhA (Barthe *et al.*, 2009; Hirasawa *et al.*, 2012; Krawczyk *et al.*, 2010). Die Deletion von *odhI* verhindert die Exkretion von Glutamat, ausgelöst durch Biotin-Limitierung oder Penicillin gänzlich (Schultz *et al.*, 2007). Unter Biotin-limitierten

Bedingungen ist OdhI überwiegend dephosphoryliert. Auch die Zugabe von Penicillin und Tween 40 führen zu einer vermehrten Dephosphorylierung von OdhI (Boulahya *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011). Es wird angenommen, dass die Membran-gebundenen Proteinkinasen PknA, PknB und PknL in der Lage sind Signale in der Cytoplasmamembran zu erkennen, über die Dephosphorylierung von OdhI die Aktivität des ODHC zu beeinflussen und somit den metabolischen Fluss Richtung Glutamatsynthese zu lenken (Abb. 4).

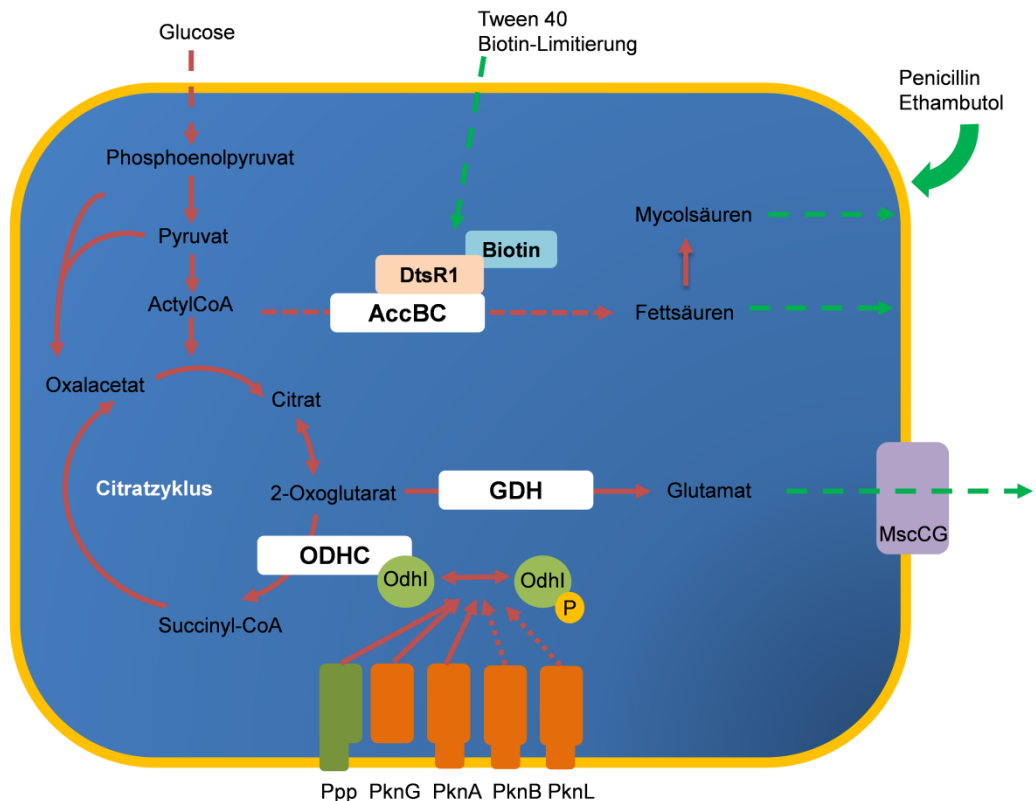


Abb. 4: Modell der möglichen molekularen Mechanismen zur Produktion von Glutamat in *C. glutamicum*. Alle Methoden zur Auslösung einer Glutamataxkretion verändern direkt oder indirekt die Zellhülle von *C. glutamicum*. Penicillin oder Ethambutol verhindern die Biosynthese der Zellwand, die Limitierung von Biotin oder Zugabe von Tween 40 inhibieren die Fettsäure- und Mycolsäuresynthese und üben so eine Veränderung auf die Cytoplasmamembran durch Änderung der Membranspannung aus. Diese Veränderung wird vom mechanosensitiven Kanal MscCG wahrgenommen und vermittelt so die Exkretion von Glutamat. Zusätzlich werden Veränderungen von Serin/Threonin-Kinasen wahrgenommen, die posttranslational die Aktivität des ODHC durch Phosphorylierung von OdhI regulieren und somit die Synthese von Glutamat begünstigen. (modifiziert nach Nakamura *et al.* 2007 und Hirasawa *et al.*, 2012)

Bis vor wenigen Jahren wurde angenommen, dass Glutamat die Cytoplasmamembran und Zellwand durch die genannten Modifikationen per Diffusion passiert. Jedoch gab es immer wieder Hinweise für die Beteiligung eines Exportproteins, da die Änderung der Zellhülle nicht essenziell für die Exkretion von Glutamat ist (Hoischen und Krämer, 1989). Es wurde beobachtet, dass die Membranpermeabilität während der Glutamataxkretion nicht verändert

war und Aminosäuren und Ionen nicht freigesetzt wurden (Hoischen und Krämer, 1990). Somit wurde vermutet, dass ein spezifischer Transporter für die Exkretion verantwortlich ist (Gutmann *et al.*, 1992). Erst vor kurzem wurde ein mechanosensitiver Kanal der MscS-Familie mit der Exkretion von Glutamat in Verbindung gebracht.

Wie erwähnt, führte die Deletion von *odhA*, einer Untereinheit des ODHC zu einer Produktion von Glutamat ohne vorheriger Auslösung durch Manipulation der Zellhülle (Asakura *et al.*, 2007). Die Deletion führte, neben der spontanen Exkretion von Glutamat geringen Ausmaßes, zu einem verschlechterten Wachstum und einem insgesamt instabilen Phänotyp (Nakamura *et al.*, 2007). Darunter wurde eine Deletionsmutante identifiziert, die spontan größere Mengen Glutamat produzierte und ein stark verringertes Wachstum aufwies. Mithilfe einer *shotgun* Klonierung dieser Mutante mit chromosomaler *C. glutamicum* ATCC 13869 DNA einer „Sau3Ai“ Bibliothek konnte eine weitere abgeleitete Mutante identifiziert werden, die ein unverändertes Wachstum zeigte und die spontane Exkretion von Glutamat unterband. Die Sequenzierung des enthaltenen Plasmids aus der Sau3Ai Bibliothek offenbarte, dass lediglich ein Gen, das für den mechanosensitiven Kanal NCgl1221 kodiert, enthalten war. Eine Sequenzanalyse der Mutante, die die starke spontane Exkretion von Glutamat aufwies, offenbarte, dass diese eine um 110 Aminosäuren verkürzte Variante dieses Gens beinhaltete. Die Integration dieser verkürzten Variante (V419::IS1207) in das Chromosom des Wildtyp ATCC 13869 durch homologe Rekombination, hatte eine massive Exkretion von Glutamat ohne vorherige Induktion zur Folge. Eine Plasmid-kodierte Überexpression von *NCgl1221* führte zu einer vermehrten Exkretion, während die Deletion die Glutamatexkretion massiv verringerte und die interne Konzentration gleichzeitig erhöhte (Nakamura *et al.*, 2007). Basierend auf diesen Beobachtungen wurde ein Modell postuliert, bei dem der mechanosensitive Kanal NCgl1221 eine entscheidende Rolle bei der Exkretion von Glutamat einnimmt. In diesem Modell würden Änderungen der Zellhülle und Manipulation der Synthese von Zellwandkomponenten mittels Tween 40, Ethambutol oder Biotin-Limitierung, die zu einer direkten Modifikation der Zellwand durch Penicillin oder Änderung der Cytoplasmamembran durch Lokalanästhetika wie Tetracain führen, und hätten Änderungen der Membranspannung und damit eine Aktivierung des mechanosensitiven Kanals zur Folge. Dabei wird auch die Möglichkeit diskutiert, bei der NCgl1221 die Aktivität des OdhI-PknG-Systems beeinflusst und so die Aktivität des ODHC reguliert um zu einer vermehrten Produktion von Glutamat zu führen.

Unbekannt ist, ob die Glutamatexkretion direkt durch den mechanosensitiven Kanal vermittelt wird oder dieser durch Reizwahrnehmung und Weiterleitung eine regulatorische

Funktion einnimmt und damit für die Aktivierung eines unbekanntes Exporters verantwortlich ist, wie beispielsweise die Proteine UhpB und UhpC als Regulatoren für das Glucose-6-Phosphat-Transportsystem UhpC von *E. coli* fungieren (Island und Kadner, 1993).

1.4 MscCG von *C. glutamicum*

Der in *C. glutamicum* ATCC13869 von NCgl1221 kodierte mechanosensitive Kanal ist homolog zu *cg1434* und kodiert in *C. glutamicum* ATCC 13032 (NC_006958) für den mechanosensitiven Kanal MscCG. MscCG besteht aus 533 Aminosäuren und zählt aufgrund von Homologien seiner Kanaldomäne zu der MscS-Familie (*mechanosensitive channel of small conductance*) mechanosensitiver Kanäle. Wie die meisten Kanäle dieser Familie agieren diese als „Notventile“ zur Freisetzung kompatibler Solute, um hypoosmotische Schocks zu überwinden und eine Zellyse aufgrund einströmenden Wassers zu verhindern. *C. glutamicum* ATCC 13032 besitzt mit *cg1001* ein Gen, das für einen zweiten mechanosensitive Kanal (MscL) kodiert. Beide Kanäle wurden in der Cytoplasmamembran von *C. glutamicum* elektrophysiologisch identifiziert und zeichnen sich durch unterschiedliche Leitfähigkeiten aus (Ruffert *et al.*, 1999; Ruffert *et al.*, 1997). MscL aus *C. glutamicum* weist eine Identität von 57% zu MscL aus *M. tuberculosis* und 38 % Identität mit MscL aus *E. coli* auf. MscCG weist eine Übereinstimmung von 38% mit Kanälen anderer Actinomyceten auf (Nottebrock *et al.*, 2003). Die größte Homologie beschränkt sich auf die N-terminale Kanaldomäne von MscCG, die mit 43% die größte Homologie zu MscS mit 286 Aminosäuren aufweist und sich hauptsächlich aus drei N-terminalen Transmembransegmenten zusammensetzt. MscCG besitzt eine zusätzliche C-terminale Domäne von 247 Aminosäuren, die nur in der Familie der *Corynebacteriaceae* zu finden ist. Für diese zusätzliche Domäne wird eine vierte Transmembrandomäne vorhergesagt, die experimentell durch C-terminale Fusion des Proteins mit einer Alkalischen-Phosphatase- β -Galactosidase-Reporterkassette (Seidel *et al.*, 2007) nachgewiesen werden konnte, womit der C-Terminus als im Periplasma lokalisiert angesehen wird (Börngen, 2009).

Nicht nur die Tatsache, dass die C-terminale Verkürzung des Homologs NCgl1221 eine spontane Exkretion von Glutamat zur Folge hatte (Nakamura *et al.*, 2007), sondern auch Beobachtungen einer erhöhten *mscCG*-Expression unter Produktionsbedingungen bei Anwesenheit von Ethambuthol (Radmacher *et al.*, 2005), verdeutlichen die Relevanz des

Kanals bei der Exkretion von Glutamat. In elektrophysiologischen Experimenten konnte gezeigt werden, dass MscCG typische Eigenschaften eines mechanosensitiven Kanals besitzt und bei der Freisetzung von Glycin-Betain und Glutamat nach hypoosmotischen Schock beteiligt ist. Außerdem verringerte die Deletion von *mscCG* in *C. glutamicum ATCC 13032* die ausgelöste Exkretion von Glutamat, während die Überexpression eine spontane Exkretion hervorrief. Zusätzlich wurde gezeigt, dass MscCG eine Rolle bei der Aufnahme von Betain bei osmotischer Kompensation nach hypoosmotischen Schock, sowie unter *steady state*-Bedingen einnimmt. In einem „*pump and leak*“ Modell wird postuliert, dass die Feinabstimmung der internen Betainkonzentration mittels aktiver Aufnahme durch den sekundär aktiven Transporters BetP und mittels Efflux durch den passiven mechanosensitiven Kanal MscCG reguliert wird (Börngen *et al.*, 2010). MscCG spielt demnach nicht nur eine Rolle bei einem hypoosmotischen Schock, sondern auch bei der Feinabstimmung der hyperosmotischen Stressantwort. Zudem wird vermutet, dass die C-terminale Domäne eine regulatorische Funktion bei der Exkretion von Glutamat übernimmt, obgleich unbekannt ist ob Glutamat durch MscCG exkretiert wird oder MscCG als Regulator eines unbekanntes Exportsystems fungiert.

1.5 Zielsetzung

Zur Bewältigung von osmotischem Stress ist *Corynebacterium glutamicum* mit verschiedenen Schutzmechanismen ausgestattet. Ein hypoosmotischer Schock wird durch Aktivierung des mechanosensitiven Kanals MscCG kompensiert, indem dieser kompatible Solute freisetzt und so eine Zellyse verhindert. Der Kanal zählt, aufgrund von Ähnlichkeiten seiner Kerndomäne, zu den mechanosensitiven Kanälen der MscS-Familie, obgleich dieser eine einzigartige zusätzliche C-terminale mit bisher unbekannter Funktion besitzt. Eine Verkürzung um 110 Aminosäuren dieser zusätzlichen Domäne offenbarte, dass der Kanal, neben Eigenschaften eines typischen mechanosensitiven Kanals und damit der Funktion als Notventil, außerdem eine Rolle bei der biotechnologischen Glutamatproduktion von *C. glutamicum* besitzt. So führte diese Verkürzung zu einer spontanen Exkretion von Glutamat, während eine Deletion von *mscCG* eine durch Penicillin ausgelöste Exkretion drastisch verringerte.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der Rolle von MscCG bei der Freisetzung von Glutamat, da bisher unbekannt war, ob Glutamat tatsächlich die Pore von MscCG passiert oder der Kanal Reize perzipiert und als möglicher Regulator eines unbekanntes Exporters fungiert. Eine besondere Beachtung sollte die zusätzliche C-terminale Domäne erhalten, die offenbar eine regulatorische Rolle bei der Exkretion von Glutamat einnimmt. Neben einer biochemischen Charakterisierung sollten elektrophysiologische Untersuchungen von MscCG-Derivaten, Aufschluss über die Funktion dieser zusätzlichen Domäne geben.

Neben der hypoosmotischen Stressantwort ist MscCG außerdem, zusammen mit dem sekundär aktiven Betain/Na⁺ Symporter BetP, an der *steady-state* Feinabstimmung der internen Solutkonzentration, nach Akkumulation von Betain unter hyperosmotischen Bedingungen, beteiligt. Bei der Untersuchung der möglicherweise regulatorischen Funktion der C-terminalen Domäne sollte der Fokus daher auch auf eine mögliche Funktion der C-terminalen Domäne bei der hyperosmotischen Stressantwort gelegt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten *Escherichia coli*- und *Corynebacterium glutamicum*-Stämme und deren Genotyp sind in folgender Tabelle (Tab. 1) aufgeführt.

Tab. 1: Verwendete *E. coli*- und *C. glutamicum*-Stämme

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Referenz
DH5α mcr	<i>endA1 supE44 thi-1 λ recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF) U196 φ80DlacZ ΔM15mcrA Δ(mmr hsdRMS mcrBC)</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990)
BL21 (DE3)	F' <i>ompT gal [dcm] [lon] hsdSB</i> (rB –mB –; an <i>E. coli</i> B Stamm) mit DE3, eine λ Prophage mit T7 RNA Polymerase Gen	Novagen (Darmstadt)
MJF465	Frag1, <i>ΔmscL::Cm</i> , <i>ΔyggB</i> , <i>ΔkefA::Km</i>	Levina <i>et al.</i> , 1999
MJF612	Frag1 <i>ΔmscL::cm</i> , <i>ΔmscS</i> , <i>ΔmscK::kan</i> , <i>ΔybdG::apr</i>	Schumann <i>et al.</i> , 2010
MJF431	Frag1, <i>ΔkefA::kan</i> , <i>ΔyggB</i> , <i>ΔyjeP</i>	(Levina <i>et al.</i> , 1999)

<i>C. glutamicum</i> Stamm	Genotyp	Referenz
ATCC 13032	Wildtyp ATCC 13032	(Abe <i>et al.</i> , 1967)
ATCC 13032 <i>ΔmscCG</i>	Derivat von ATCC 13032 mit einer <i>in frame</i> -Deletion des <i>mscCG</i> Gens	(Börngen, 2009)
ATCC 13032 <i>ΔmscL ΔmscCG</i>	Derivat von ATCC 13032 mit einer <i>in frame</i> -Deletion des <i>mscL</i> und <i>mscCG</i> Gens	(Börngen, 2009)

In folgender Tabelle (Tab. 2) sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgeführt.

Tab. 2: Verwendete Plasmide für *E. coli* und *C. glutamicum*

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pEKEx2	Km ^R , tac promotor, oriV _{E.c.} , oriV _{C.g.}	(Eikmanns <i>et al.</i> , 1991)
pEKEx2_mscCG-his	pEKEx2 mit <i>mscCG</i> -his ₆ zur Überexpression von MscCG mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	(Börngen, 2009)
pEKEx2_mscCGΔ110-his	pEKEx2 mit <i>mscCGΔ110</i> -his ₆ zur Überexpression von MscCGΔ110 mit C-terminaler Verkürzung um 110 AS und (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_mscCGΔ132-his	pEKEx2 mit <i>mscCGΔ132</i> -his ₆ zur Überexpression von MscCGΔ132 mit C-terminaler Verkürzung um 132 AS und (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	(Börngen, 2009)
pEKEx2_mscCGΔ141-his	pEKEx2 mit <i>mscCGΔ141</i> -his ₆ zur Überexpression von MscCGΔ141 mit C-terminaler Verkürzung um 141 AS und (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_mscCGΔ128-His	pEKEx2 mit <i>mscCGΔ128</i> -his ₆ zur Überexpression von MscCGΔ128 mit C-terminaler Verkürzung um 128 AS und (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_mscCGΔ247-his	pEKEx2 mit <i>mscCGΔ247</i> -his ₆ zur Überexpression von MscCGΔ247 mit C-terminaler Verkürzung um 247 AS und (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	(Börngen, 2009)
pEKEx2_mscCGΔ53-his	pEKEx2 mit <i>mscCGΔ53</i> -his ₆ zur Überexpression von MscCGΔ53 mit C-terminaler Verkürzung um 53 AS und (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_mscCGΔ21-his	pEKEx2 mit <i>mscCGΔ21</i> -his ₆ zur Überexpression von MscCGΔ21 mit C-terminaler Verkürzung um 21 AS und (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_mscCGΔ97-his	pEKEx2 mit <i>mscCGΔ97</i> -his ₆ zur Überexpression von MscCGΔ97 mit C-terminaler Verkürzung um 97 AS und (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit

	Überexpression von MscCG Δ 97 mit C-terminaler Verkürzung um 97 AS und (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	
pEKex2_mscS--his	pEKex2 mit <i>mscS</i> -his ₆ zur Überexpression von MscS mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	(Börngen, 2009)
pEKex2_mscS/CT_mscCG-his	pEKex2 mit <i>mscS</i> , fusioniert mit der C-terminalen Domäne von <i>mscCG</i> -his ₆ zur Überexpression von MscS/Ct_mscCG-His mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	(Börngen, 2009)
pEKEx2_mscCG_L109C-his	pEKex2 mit <i>mscCG_L109C</i> -his ₆ zur Überexpression von MscCG_L109C mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_mscCG_A51D_V70D-his	pEKex2 mit <i>mscCG_A51D_V70D</i> -his ₆ zur Überexpression von MscCG_A51D_V70D mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_mscCG_M86D_L41D-his	pEKex2 mit <i>mscCG_M86D_L41D</i> -his ₆ zur Überexpression von MscCG_M86D_L41D mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_mscCG_L31N_L93N-his	pEKex2 mit <i>mscCG_L31_L93N</i> -his ₆ zur Überexpression von MscCG_L31N_L93N mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_mscCG_F78N_I45N-his	pEKex2 mit <i>mscCG_F78N_I45N</i> -his ₆ zur Überexpression von MscCG_F78N_I45N mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_mscCG_F79N_I46N-his	pEKex2 mit <i>mscCG_F79N_I46N</i> -his ₆ zur Überexpression von MscCG_F79N_I46N mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_mscCG_M86N_M41N-his	pEKex2 mit <i>mscCG_M86N_M41N</i> -his ₆ zur Überexpression von MscCG_M86N_M41N mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit

	tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	
pEKEx2_mscCG_A51N_V70N-His	pEKex2 mit <i>mscCG_A51N_V70N-his₆</i> zur Überexpression von MscCG_A51N_V70N mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_mscCG_F78N_I46N-his	pEKex2 mit <i>mscCG_F78N_I46N-his₆</i> zur Überexpression von MscCG_F78N_I46N mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_mscCG_F79_I45N-His	pEKex2 mit <i>mscCG_F79_I45N-his₆</i> zur Überexpression von MscCG_F79_I45N mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_mscs/CT_mscCG_L109S-his	pEKex2 mit <i>mscs/CT_mscCG_L109S-his₆</i> zur Überexpression von Mscs/CT_MscCG_L109S mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_mscCG-TEV-His	pEKex2 mit <i>mscCG-TEV-his₆</i> zur Überexpression von MscCG mit TEV-Schnittstelle und C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_mscCG_I75S-his	pEKex2 mit <i>mscCG_I75S-his₆</i> zur Überexpression von MscCG_I75S mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_mscs/mscCG110-his	pEKex2 mit <i>mscS/mscCG110-his₆</i> zur Überexpression von MscS mit 110 C-terminalen AS von MscCG und (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_mscCG_Q112L_V115S-his	pEKex2 mit <i>mscCG_Q112L_V115S-his₆</i> zur Überexpression von MscCG_Q112L_V115S mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEX2_mscS/Ct_mscCGΔ110-his	pEKex2 mit <i>mscS</i> , fusioniert mit der um 110 AS verkürzten C-terminalen Domäne von <i>mscCG</i> zur Überexpression von MscS/Ct_mscCGΔ110 mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in	diese Arbeit

C. glutamicum

pEKEx2_mscCG_Δ397-405-his	pEKex2 mit <i>mscCGΔ397-405-his₆</i> zur Überexpression von MscCGΔ397-405 mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_mscCG_Ala397-405-his	pEKex2 mit <i>mscCG_Ala397-405-his₆</i> zur Überexpression von MscCG_Ala397-405 mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_mscCG_I107S-his	pEKex2 mit <i>mscCG_I107S-his₆</i> zur Überexpression von MscCG_I107S mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_mscCG_V115S-his	pEKex2 mit <i>mscCG_V115S-his₆</i> zur Überexpression von MscCG_V115S mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_mscCGΔ110_Ala406-423-his	pEKex2 mit <i>mscCGΔ110_Ala406-423-his₆</i> zur Überexpression von MscCGΔ110_Ala406-423 mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_mscCGΔ97_Ala424-436-his	pEKex2 mit <i>mscCGΔ110_Ala406-423-his₆</i> zur Überexpression von MscCGΔ110_Ala406-423 mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_mscS/CT_mscCG_Ala406-423-his	pEKex2 mit <i>mscS/CT_mscCG_A406-423-his₆</i> zur Überexpression von MscS/CT_MscCG_A406-423 mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_mscCG_Ala406-423-his	pEKex2 mit <i>mscCG_Ala406-423-his₆</i> zur Überexpression von MscCG_Ala406-423 mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_mscS/CT_MscCG_Δ406-423-His	pEKex2 mit <i>mscS/Ct_mscCG_Δ406-423-his₆</i> zur Überexpression von MscS/Ct_MscCG_Δ406-423 mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit

pEKEx2_ <i>mscCG</i> Δ406-423-his	pEKex2 mit <i>mscCG</i> _Δ406-423-his ₆ zur Überexpression von MscCG_Δ406-423 mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx_ <i>mscCG</i> Δ110_ random287-401-his	pEKex2 mit <i>mscCG</i> Δ110_ random287-401-his ₆ zur Überexpression von MscCGΔ110_ random287-401 mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pQE60	Am ^r , T5 promotor, Col E1	Qiagen (Hilden)
pQE60_ <i>lacI</i>	pQE60 mit integriertem <i>lacI</i> Gen	(Börngen, 2009)
pQE60_ <i>lacI</i> _ <i>mscCG</i>	pQE60_ <i>lacI</i> mit <i>mscCG</i> zur Überexpression von MscCG in <i>E. coli</i>	(Börngen, 2009)
pQE60_ <i>lacI</i> _ <i>mscCG</i> Δ110	pQE60_ <i>lacI</i> mit <i>mscCG</i> Δ110 zur Überexpression von MscCGΔ110 in <i>E. coli</i>	(Börngen, 2009)
pQE60_ <i>lacI</i> _ <i>mscCG</i> Δ132	pQE60_ <i>lacI</i> mit <i>mscCG</i> Δ132 zur Überexpression von MscCGΔ132 in <i>E. coli</i>	(Börngen, 2009)
pQE60_ <i>lacI</i> _ <i>mscCG</i> Δ247	pQE60_ <i>lacI</i> mit <i>mscCG</i> Δ247 zur Überexpression von MscCGΔ247 in <i>E. coli</i>	(Börngen, 2009)
pQE60_ <i>lacI</i> _ <i>mscCG</i> Δ141	pQE60_ <i>lacI</i> mit <i>mscCG</i> Δ141 zur Überexpression von MscCGΔ141 in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pQE60_ <i>lacI</i> _ <i>mscCG</i> _ Q112L_ V115S	pQE60_ <i>lacI</i> mit <i>mscCG</i> _ Q112L_ V115S zur Überexpression von MscCG_ Q112L_ V115S in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pQE60_ <i>lacI</i> _ <i>mscCG</i> _ A106V	pQE60_ <i>lacI</i> mit <i>mscCG</i> _ A106V zur Überexpression von MscCG_ A106V in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pQE60_ <i>lacI</i> _ <i>mscS</i>	pQE60_ <i>lacI</i> mit <i>mscS</i> zur Überexpression von MscS in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pQE60_ <i>lacI</i> _ <i>mscL</i>	pQE60_ <i>lacI</i> mit <i>mscL</i> zur Überexpression von MscL in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pET29b	Km ^R , P _{T7}	Novagen Inc.

(Madison, USA)

pET29b_ <i>mscCG-his</i>	pET29b mit <i>mscCG-his</i> ₆ für die Überexpression von MscCG mit C-terminaler (His) ₆ -tag Fusion in <i>E. coli</i>	Nina Möker
pDrive_ <i>mscCG-his</i>	pDrive mit <i>mscCG-his</i> ₆ zur Zwischenklonierung von <i>mscCG</i> in <i>E. coli</i>	Börngen, 2009

2.2 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 20 im Anhang aufgeführt.

2.3 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung von *E. coli* DH5 α mc_r (Grant *et al.*, 1990) und *E. coli* MJF Stämmen (Levina *et al.*, 1999; Schumann *et al.*, 2010), sowie der in dieser Arbeit verwendeten *C. glutamicum* ATTC 13032 Stämme (Abe *et al.*, 1967) erfolgte in Schikanekolben unter aeroben Bedingungen mit 125 rpm (*revolutions per minute*). Die Anzucht von *E. coli* in Komplexmedien erfolgte bei einer Temperatur von 37°C in LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989), die Anzucht von *C. glutamicum* bei 30°C in BHI (*brain-heart-infusion*, Difco und Oxoid- ThermoFisher Scientific).

Für Wachstums- und Exkretionsversuche mit *C. glutamicum* wurde CgXII-Minimalmedium verwendet. Die Bestimmung der optischen Zelldichte (OD₆₀₀) erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm (Spektrophotometer Novaspec II, Pharmacia Biotech Inc.). Dabei wurde bei einer OD₆₀₀ von 1 von einer Zelltrockenmasse von 34 mg/ml ausgegangen. Vorkultivierungen von *C. glutamicum* erfolgten in BHI-Medium über 8 h und wurden nach Waschen mit CgXII-Medium oder einer 0,9% NaCl-Lösung, für das Animpfen in CgXII-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,5 verwendet. Die Plasmid-kodierte Expression von Proteinen erfolgte über Nacht standardmäßig durch Zugabe von 25 μ M IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid). Die so über 16 h inkubierte Kultur wurde anschließend für das Animpfen der Hauptkultur verwendet. Zur Selektion von *E. coli*-Zellen wurden jeweils Plasmid-abhängig 100 μ g/ml oder für *C. glutamicum* 25 μ g/ml der Antibiotika Kanamycin

oder Carbenicillin verwendet. Für Wachstum auf Agar-Platten wurden den Komplexmedien jeweils 15 g/l Agar zugesetzt.

LB-Medium:

10 g/l Trypton
5 g/l Hefeextrakt
10 g/l NaCl

CGXII-Medium:

20 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
5 g/l Urea
1 g/l KH_2PO_4
1,6 g K_2HPO_4
42 g/l MOPS
2,9 g/l NaCl
40 g/l Glukose
0,25 g/l MgSO_4
0,01 g/l CaCl_2
0,2 mg/l Biotin
30 mg/l Protocatechuat
1 ml/l Spurensalzlösung
(pH 7)

Spurensalzlösung:

10 g/l $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
10 g/l $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
1 g/l $\text{ZnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
0,2 g/l $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
20 mg/l $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$

2.4 Molekularbiologie Methoden

2.4.1 Herstellung transformationskompetenter *E. coli* und Transformation

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden *E. coli* zuvor für Aufnahme von Fremd-DNA manipuliert. Dazu wurden 5 ml LB-Medium mit einer Kolonie von *E. coli* von einer LB-Agar-Platte beimpft und über 8 h bei einer Temperatur von 37°C kultiviert. Anschließend wurden 125 ml SOB-Medium mit 1 ml der Vorkultur beimpft. Nach einer Inkubationszeit von 16 h bei 37°C wurden die Zellen 10 min auf Eis abgekühlt und mittels Zentrifugation bei 2500 rpm und 4°C geerntet. Die sedimentierten Zellen wurden anschließend in 40 ml TB-Puffer aufgenommen, erneut über 10 min auf Eis inkubiert und wiederholt zentrifugiert. Das Zellsediment wurde dann in 10 ml TB-Puffer aufgenommen und unter leichtem Schwenken tropfenweise 700 µl DMSO hinzugegeben. Zur Lagerung der transformationskompetenten Zellen wurden jeweils 100 µl der Zellsuspension in

vorgekühlten Reaktionsgefäßen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurden die präparierten Zellen auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von Plasmid-DNA oder eines Ligationsansatzes über 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30-45 s einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und abschließend in 800 µl LB-Medium aufgenommen. Nach Inkubation über 1 h bei 37°C erfolgte die Selektion Plasmid-tragenden Klone auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika.

SOB-Medium:

5 g/l Trypton
1,25 g/l Hefeextrakt
0,125 g/l NaCl
2,5 mM KCl x H₂O
10 mM MgCl₂

TB-Puffer:

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

2.4.2 Herstellung transformationskompetenter *C. glutamicum* Zellen und Transformation

Zur Transformation von *C. glutamicum* Zellen mittels Plasmid-DNA erfolgte zunächst die Präparation elektrokompenter Zellen. Dazu wurden *C. glutamicum* von einer BHI-Agarplatte in 5 ml LB mit 2% Glukose übereimpft und 16 h bei 30°C und 125 rpm kultiviert. Diese Kultur wurde in 25 ml LB mit 2% Glukose überführt und 8 h unter gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde diese Kultur zum Beimpfen von 250 ml LB-I-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,3 verwendet. Anschließend erfolgte eine Kultivierung über 16 h bei 20°. Nach 20-minütiger Kühlung auf Eis wurden die Zellen mittels Zentrifugation mit 4000 rpm bei 4°C, über 10 min geerntet und mehrmals mit einer eiskalten Lösung 10% Glycerins gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen in 1 ml Glycerin-Lösung resuspendiert und jeweils 55 µl in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert. Diese wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurden aliquotierte Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1-3 µl Plasmid-DNA versetzt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis, wurde der Ansatz in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (2 mm Küvette, Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld) überführt. Die Elektroporation erfolgte mit einem Gene-Pulser (Biorad, München) bei 2,5 kV, 600 Ω und 25 µF über ca. 5 µs. Die elektroporierten Zellen wurden dann in 3 ml BHIS-Medium aufgenommen und 1 h bei 30°C inkubiert. Nach Zentrifugation (4000 rpm, 3 min,

4°C) wurden die Zellen auf BHI-Agarmedium mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

LB-I-Medium:

10 g/l Trypton
5 g/l Hefeextrakt
10 g/l NaCl
4 g/l Isonicotinsäurehydrazid
25 g/l Glycin
0,1% (v/v) Tween 80

BHIS-Medium:

BHI-Medium
0,5 M Sorbitol

2.4.3 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *C. glutamicum*

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *C. glutamicum* erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Dafür wurden jeweils 5 ml Komplexmedium mit einer Einzelkolonie *E. coli* oder *C. glutamicum* beimpft und über Nacht kultiviert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte schließlich mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) oder mit dem High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) nach Angaben der Hersteller. Für die Plasmid-Isolation aus *C. glutamicum* wurde die Zellsuspension zuvor mit Puffer A1 15 mg/ml Lysozym für 1-2 h bei 37°C präinkubiert. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde in 50 µl H₂O eluiert.

2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Auftrennung und Reinigung von DNA nach einer Restriktion oder PCR, wurde eine Gelelektrophorese mit 1%iger Agarose in TAE-Puffer durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Auftragung wurden 6x *Loading Dye* (Fermentas) bzw. zur Auftrennung nach Restriktion 10 x *Green Buffer* (Fermentas) verwendet. Die Detektion der DNA erfolgte in Ethidiumbromidlösung mit einer Konzentration von ca. 5 mg/l. Zur Visualisierung und Dokumentation wurde das Image Master VDS System (Amersham Biosciences) verwendet. Die Isolierung aufgetrennter DNA aus der Gelmatrix wurde mit Hilfe des Reaktionskits

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde in 10-20 µl H₂O eluiert.

TAE-Puffer:

40 mM Tris

1 mM EDTA

pH 8

2.4.5 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde eine PCR (*Polymerase-Chain-Reaction*) (Mullis *et al.*, 1986) durchgeführt. Dabei wurden zwei spezifische Oligonukleotide verwendet, die den zu amplifizierenden Bereich flankieren. Die Konzentration der verwendeten Oligonukleotide lag bei 10 pmol/µl in H₂O. Als Polymerase wurde die thermostabile *Phusion*- (Fermentas) oder *Precisor*-Polymerase (BioCat) verwendet. Die Reaktionsansätze beinhalteten neben den Oligonukleotiden und der Polymerase, außerdem die zu amplifizierende DNA-Zielsequenz (Plasmid- oder chromosomale DNA), dNTPs (Desoxynukleosid-Triphosphate) und vom Hersteller der Polymerase bereitgestellte Puffer mit Mg²⁺-Ionen. Jede PCR wurde spezifisch für das zu amplifizierende DNA Fragment optimiert und 30 Mal wiederholt. Nach einer 5 minütigen Initialdenaturierung bei 98°, erfolgte eine 30-sekündige Denaturierungsphase, eine 30-sekündige Hybridisierung der Oligonukleotide, dessen Temperatur abhängig seiner Zusammensetzung gewählt wurde (ca. 4°C für Cytosin oder Guanin und 2°C für Adenin und Thymin), sowie einer Amplifizierung der DNA durch die Polymerase bei einer Temperatur von 72°C. Die Zeit der Amplifizierung war dabei abhängig von der Länge des Amplifikats und richtete sich nach der Geschwindigkeit der Polymerase (ca. 15-30 sec/1 kb). Final erfolgte eine verlängerte Elongation über einen Zeitraum von 5 min, bevor der Reaktionsansatz auf 4°C abgekühlt wurde. Das PCR-Programm wurde mit Hilfe der Thermocycler *mastercycler*® gradient und *Mastercycler*® personal (Eppendorf) durchgeführt.

Zur Überprüfung der Plasmid-DNA, wurde nach einer Transformation außerdem eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dabei wurde abweichend der vorgemischte Reaktionsansatz (2 x Econo Taq PLUS GREEN (Lucigen) verwendet. Entsprechende Oligonukleotide sowie eine Zellkolonie der zu testenden Stämme wurden dem Ansatz hinzugefügt.

Beispielansatz:

35 µl *A. dest*
 10 µl Reaktionspuffer
 1 µl dNTPs (10 mM)
 1 µl Matrizen-DNA
 1 µl Primer_fw (10 pmol/µl)
 1 µl Primer_rev (10 pmol/µl)
 1 µl Polymerase (2 U/µl)

Beispielprogramm:

98°C: 5 min
 98°C: 30 sec
 60°C: 30 sec
 72°C: 30 s/1 kb
 72°C: 5 min
 4°C

} 30x

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon synthetisiert und sind in Tabelle 20 aufgeführt.

2.4.6 Ortsgerichtete Mutagenese und Fusion von DNA-Fragmenten mittels PCR

Für die ortsgerechte Mutagenese wurden das Prinzip der Quickchange Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies) mittels PCR (modifiziert nach (Hutchison *et al.*, 1978) und (Vandeyar *et al.*, 1988)) verwendet.

Bei dieser PCR werden Oligonukleotide verwendet, die die gewünschte Mutation beinhalten um damit ein komplettes Matrizen-Plasmid zu amplifizieren. Das methylierte Matrizen-Plasmid wurde nach der PCR mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut. Die von DpnI unverdaute, amplifizierte DNA wurde anschließend in kompetente *E. coli* DH5α transformiert, in denen das amplifizierte DNA-Fragment vervielfältigt wird.

Beispielansatz:

34,5 µl *A. dest*
 10 µl Reaktionspuffer
 2,5 µl dNTPs (20 mM)
 0,5 µl Primer_fw (10 pmol/µl)
 0,5 µl Primer_rev (10 pmol/µl)
 1 µl Polymerase (2U/µl)
 1 µl Plasmid-DNA

Beispielprogramm:

98°C: 2 min
 98°C: 30 sec
 65°C: 30 sec
 72°C: 11 min
 72°C: 10 min
 4°C

} 18x

Für die Teildeletion von DNA-Fragmenten oder die Insertion von spezifischen DNA-Sequenzen in Plasmid-DNA wurde ebenfalls die PCR verwendet. Dabei wurden Oligonukleotide erstellt, die überlappende DNA-Fragmente am 3'-Ende besitzen (Horton *et al.*, 1989; Yon und Fried, 1989). Mittels PCR konnten so überhängende und komplementäre DNA-Stränge verknüpft und DNA-Fragmente spezifisch entfernt oder eingefügt werden.

2.4.7 Restriktion, Ligation und Sequenzierung von DNA

Für die enzymatische Restriktion von DNA, wurden FastDigest® Restriktionsendonukleasen, sowie Puffer der Firma Fermentas (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers verwendet. Plasmid-DNA wurde in Abhängigkeit der Konzentration mindestens 1 h verdaut. Zur Ligation von DNA-Fragmenten mit linearisierter Plasmid-DNA (Verhältnis: ca. 3:1), wurde eine T4-DNA-Ligase (Fermentas, Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Ligation erfolgte bei einer Temperatur von ca. 20°C über einen Zeitraum von 1-2 h. Die Reaktion wurde durch Inaktivierung der Ligase bei 65°C über 10 min gestoppt und anschließend wie unter 2.4.1 mit *E. coli* transformiert. Sequenzanalysen von Plasmid-DNA wurden von GATC Biotech durchgeführt.

2.4.8 Konstruktion von Plasmiden

Die Konstruktion von Plasmiden erfolgte nach molekularbiologischen Standardmethoden und wurde mittels DNA-Sequenzanalyse (2.4.7) verifiziert. Zur Klonierung von Genen in *E. coli* oder *C. glutamicum*-spezifische Plasmid-Vektoren wurden als DNA-Matrix chromosomale DNA, Plasmid-DNA und Bakterienzellen (Kolonie-PCR) verwendet. Für die Expression in *E. coli* wurde das Plasmid pQE60_lacI mit *Nco*I und *Bam*HI linearisiert und mit dem vorverdauten DNA-Fragment ligiert. Zur Expression in *C. glutamicum* wurden mit *Bam*HI und *Not*I linearisierte pEKEx2-Plasmide (Eikmanns *et al.*, 1991) verwendet. Mittels PCR amplifizierte DNA-Fragmente wurden zuvor ebenfalls mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen verdaut.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Zellaufschluss und Membranpräparation von *E. coli* und *C. glutamicum*

Zur Kontrolle der Plasmid-kodierten Expression von MscCG und Derivaten wurden entsprechende Zellen zunächst sedimentiert und in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,5, Complete® Protease-Inhibitor und DNaseI) aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend dreimalig mit der Zelmühle FastPrep™ (Thermo) oder dem Homogenisator Precellys® (PeqLab) bei maximaler Geschwindigkeit über 45 sec aufgeschlossen. Die anschließende Trennung der Zelltrümmer vom Überstand erfolgte durch Zentrifugation über 20 min bei 14000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde erneut bei 80000 rpm, zentrifugiert und die sedimentierte Membranfraktion in 100 mM Kaliumphosphatpuffer resuspendiert. Membranpräparationen in größerem Maßstab erfolgten nach Zellaufschluss mittels FrenchPress mit einem Volumen von maximal 40 ml mit 1200 psi.

2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellextrakt und Membranfraktionen erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976). Als Farbreagenz wurde Roti-NanoQuant® (Carl Roth) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Kalibrierung erfolgte mit BSA (*Bovine Serum Albumine*) unterschiedlicher Konzentration.

2.5.3 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach Molekülmasse erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Dabei wurden 12%ige SDS-Polyacrylamidgele vertikal in einer Proteingel-Apparatur (Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra System oder Bioemtra Minigel-Twin) gegossen und Membranpräparationen mit Ladebuffer (4x) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte diskontinuierlich bei einer Spannung von 60 V über 40 min und 150 V über einen Zeitraum von zwei Stunden.

4x SDS-Probenpuffer:

4% SDS
25% Glycerin
0,5 M Tris/HCl pH 7,5
0,05 % Coomassie Brilliant Blau G

Elektrophoresepuffer:

24 mM Tris
192 mM Glycin
3,5 mM SDS
pH 8,2 mit HCl

Trenngelpuffer:

1,5 M Tris
0,4 % SDS
pH 8,8 mit HCl

Sammelgelpuffer:

0,5 M Tris
0,4 % SDS
pH 6,75 mit HCl

Trenngel (12%):

1,5 ml Trenngelpuffer
2,21 ml A. dest
2,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
40 µl APS (100 mg/ml)
4 µl TEMED

Sammelgel:

625 µl Sammelgelpuffer
1,465 ml A. dest
410 µl 2,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
11,25 µl APS (100 mg/ml)
3,75 µl TEMED

2.5.4 Coomassie-Blau-Färbung von SDS-Gelen

Die Färbung, SDS-Gelelektrophorese getrennter Proteine (2.5.3) erfolgte mittels Coomassie-Blau-Färbung (Sambrook *et al.*, 1989). Die Proteingele wurden dabei über einen Zeitraum von 1-12 h in einer Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend entfärbt bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren.

Coomassie-Färbelösung:

45 % Ethanol
10 % Essigsäure
2,5 g Serva Coomassie Brilliant Blau G 250

Entfärbelösung:

10 % Essigsäure
10 % Methanol

2.5.5 Transfer, Immobilisierung und immunologische Detektion von Proteinen (Western-Blot)

Zur Überprüfung der Expression von Proteinen wurde der immunologische Nachweis mithilfe spezifischer Antikörper durchgeführt (Towbin *et al.*, 1979). Nach gelelektrophoretischer Auftrennung von Proteinen (2.5.3) wurden diese aus den Polyacrylamid-Gelen auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid) transferiert (GE Healthcare, Porengröße 0,45 μM). Vor dem Transfer wurde die Membran zunächst in Methanol inkubiert und dann in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte in einem *semi-dry*-Verfahren oder mittels Kapillarblot. Bei dem *semi-dry*-Transfer wurde eine Blotapparatur (Biometra) verwendet, in der vier in Transferpuffer getränkte Whatman Filterpapiere (Whatman, 3 mm), die äquilibrierte PVDF-Membran, das Polyacrylamidgel und erneut 4 in Transferpuffer getränkte Whatman Filterpapiere gestapelt wurden. Der Proteintransfer erfolgte über einen Zeitraum von 45 min bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm². Bei dem Kapillarblotverfahren wurden 2 PVDF-Membranen in Methanol inkubiert und in Towbin-Puffer äquilibriert. Für den Transfer wurden zwischen 2 Glasplatten, 4 in Towbin-Puffer getränkte Whatman Filterpapiere, eine äquilibrierte PVDF-Membran, das Polyacrylamidgel, die zweite PVDF-Membran, gefolgt von 4 in Towbin-Puffer getränkten Whatman Filterpapieren, gestapelt. Der Proteintransfer auf die PVDF-Membranen erfolgte über 16 h unter Druck auf die obere Glasplatte durch Kapillarkräfte.

Nach Transfer wurde die Membran zunächst über mindestens 2 h bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer und mit dem ersten Antikörper (Penta-His, Isotyp: Maus IgG1, Qiagen oder Anti-MscCG, Eurogentech) in einer Verdünnung von 1:2000 bzw. 1:1000 in Blockierungspuffer über einen Zeitraum von 1-2 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS-Puffer, wurde diese mit dem Zweitantikörper mit konjugierter alkalischen Phosphatase (Anti-Maus IgG, oder Anti-Kaninchen IgG, Sigma-Aldrich) mit einer Verdünnung von 1:1000 in Blockierungspuffer 1 h inkubiert. Die Detektion erfolgte nach dreimaligem Waschen mit TBS-Puffer über jeweils 10 min, durch Zugabe einer NBT/BCIP-Lösung in AP-Puffer im Dunkeln bis zur gewünschten Signalstärke. Die Phosphatasereaktion wurde durch Waschen mit *A. dest* gestoppt und die Membran anschließend getrocknet.

Transferpuffer:

10 mM CAPS
10 % Methanol
pH 11

TBS-Puffer:

10 mM Tris
150 mM NaCl
pH 7,5

Towbin-Puffer:

25 mM Tris
192 mM Glycin

Blockierungspuffer:

TBS-Puffer
3 % BSA

Alkalische-Phosphatase-Puffer

100 mM Tris
100 mM NaCl
5 mM MgCl₂
pH (HCl) 9,5

NBT/BCIP -
Lösung:

10 ml AP-Puffer
0,0165 % BCIP
0,033 % NBT

2.5.6 Isolierung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie

Zur Expression und anschließenden Isolierung von MscCG-His wurde das Plasmid pET29b_mscCG-his in *E. coli* BL21 verwendet. Durch die C-terminal angehängte Sequenz die für sechs Histidine kodiert, konnte das Protein nach Expression mittels Affinitätschromatographie isoliert werden. Die Expression erfolgte in TB-Medium, nach einer Vorkultivierung in 100 ml Medium bei 37°C. Bei einer OD₆₀₀ von 1-1,2 erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von IPTG auf eine Endkonzentration von 1 mM und Glycerin auf eine Endkonzentration von 0,4 %. Die Expression erfolgte dann über einen Zeitraum von 4 h bei einer Temperatur von 26°C.

Nach Ernte durch Zentrifugation (5000 rpm, 20 min, 4°C) wurden die Zellen in Aufschlusspuffer resuspendiert und mittels FrenchPress bei einem Druck von 1200 psi aufgeschlossen. Anschließend erfolgte die Trennung der Zelltrümmer mittels Zentrifugation bei 12.500 rpm und 4°C über 30 min. Die Gewinnung der Membranfraktion erfolgte mittels Ultrazentrifugation mit 55.000 rpm und 4°C über 1 h. Die Membranfraktion wurde dann in ca. 10 ml 50 mM Tris pH 7,4 mit 10% Glycerin aufgenommen und für die Solubilisierung mit DDM (n-Dodecyl β-D-Maltosid) verwendet. Durch die tropfenweise Zugabe von 550 µl einer 20%-DDM-Lösung unter Rühren erfolgt die Solubilisierung von MscCG-His, um anschließend nach einer Verdünnung von 1:4 mit 1 ml CoNTA-Material inkubiert zu werden. Das CoNTA-Material wurde zuvor mit Puffer äquilibriert und mit dem Solubilisat insgesamt über Nacht bei einer Temperatur von 4°C inkubiert. Die Isolierung der

PolyHistidin-markierten Proteine erfolgte dann in einem *batch*-Verfahren mittels *gravity-flow*. Dazu wurden das CoNTA-Material auf eine Säule gegeben und gebundene Proteine schrittweise mit Waschpuffer und Elutionspuffer mit steigender Imidazol-Konzentration in verschiedenen Fraktionen eluiert. Zur Erhöhung der Proteinkonzentration wurden Elutionsfraktionen nach Überprüfung der Proteinkonzentration mit Amicon® Filtereinheiten eingengt und von Imidazol befreit.

Aufschlusspuffer:

100 mM Tris
Complete Protease-Inhibitor
DNaseI
pH 7,5

TB-Medium:

12 g/l Trypton
24 g/l Hefeextrakt
0,4 % Glycerin
100 ml/l Phosphatpuffer (23,14g/lKH₂PO₄,125g/l
K₂HPO₄)

Waschpuffer:

50 mM Tris pH7,5
10 % Glycerin
1 mM DDM
(+ 5 mM Imidazol)

Elutionspuffer:

50 mM Tris pH 7,5
10 % Glycerin
1 mM DDM
300 mM Imidazol

2.6 Analytische Methoden

2.6.1 Bestimmung der Osmolalität von Lösungen

Zur Bestimmung der Osmolalität von Lösungen wurde ein Osmometer (Osmomat 030, Gonotec) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dabei wird nach dem Prinzip der Gefrierpunktniedrigung, der Gefrierpunkt einer Probe gemessen und mit bekannten verglichen. Zur Kalibrierung wurden Kalibrierungslösungen des Herstellers von 0,1 osmol/kg bis 1,2 osmol/kg eingesetzt.

2.6.2 HPLC-Analyse

Zur Bestimmung der Konzentration von Glutamat in Lösungen mittels HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) wurde das VWR/Hitachi System EliteLaChrom mit der Pumpeinheit L-2130, dem Säulentermostat L-2300 und dem Fluoreszenz-Detektor L-2485 verwendet. Das in den Proben enthaltene Glutamat wurde einer Vorsäulenderivatisierung mit OPA-Reagenz (o-Phtaldidehyd/Borat/2-Mercaptoethanol, Thermo Scientific) unterzogen. Dabei werden primäre Amine zu fluoreszierenden Thio-substituierten Isoindolverbindungen derivatisiert, deren Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und Emmisionswellenlänge von 450 nm detektiert werden kann. Die Probenlösungen wurden mit einer *reversed-phase*-Vorsäule RP-18 (Multospher 40x4 mm, CS Chromatographie), gefolgt von einer RP-18 *reversed-phase*-Hauptsäule (Nucleodur® RP-18, 125 x 4 mm, Macherey-Nagel) getrennt. Die Flussrate betrug 1 ml / min bei einer Säulentemperatur von 35°C. Die mobile Phase bestand aus programmabhängigen Mischungen von Puffer A und Puffer B. Zur Berechnung der Glutamatkonzentrationen wurde eine Kalibrierung mit 10 µM, 50 µM, 100 µM und 250 µM Glutamat durchgeführt und anhand der erhaltenen *Peak*-Flächen automatisch ermittelt.

Tab. 3: HPLC-Programm zur Bestimmung der Glutamatkonzentration

Zeit [min]	Puffer A [%]	Puffer B [%]
0	90	10
3	80	20
3,5	70	30
5,5	62	38
12	90	10

Puffer A:

40 mM Natriumacetat

0,06 % Natriumazid

5 % (v/v) Methanol/Acetonitril 1:1

Puffer B:

50 % Acetonitril

50 % Methanol

2.7 Biochemische Methoden

2.7.1 Betainaufnahme und -Efflux während osmotischer Kompensation

Die enzymatische Synthese von radioaktiv markiertem Glycin-Betain erfolgte nach Landfald und Strom (Landfald und Strøm, 1986), wie zuvor beschrieben (Peter *et al.*, 1996). Zur Messung der Betainaufnahme, wurden *C. glutamicum* Zellen unter hyperosmotischen Bedingungen bei 30°C und 125 rpm, aerob über Nacht in 25 ml BHI-Medium mit 0,5 M NaCl kultiviert. Die Zellen wurden anschließend mittels Zentrifugation (6 min, 4°C, 4000 rpm) geerntet und zweimal mit eiskaltem *Downshock*-Puffer gewaschen. Dieser hypoosmotische Waschschrift führt zu einem Efflux kompatibler Solute, die während der Vorkultivierung in Komplexmedium synthetisiert oder aufgenommen wurden. Anschließend wurden die Zellen in gekühltem *Uptake*-Puffer mit einer OD₆₀₀ von ca. 4 aufgenommen und [¹⁴C]-Glycin-Betain mit einer Endkonzentration von 1 mM (ca. 25.000 cpm/ml) zugegeben. Zur Messung der Betainaufnahme wurden 200 µl der Zellsuspension entnommen und sofort auf Glasfaserfilter (Millipore) filtriert. Die Filter wurden direkt mit 3 ml *Uptake*-Puffer gewaschen und die Radioaktivität wurde nach Zugabe von 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit (CarlRoth) mit einem Flüssigszintillationszähler (LS 6500, Beckman Instruments) gemessen. Um die Abgabe und Aufnahme von Betain zu ermitteln, wurde unmarkiertes Betain mit einem deutlichen Überschuss von 50 mM hinzugegeben und Proben wie beschrieben entnommen. So konnte der Netto-Efflux von Betain anhand der Änderung der internen Konzentration radioaktiv markierten Betains innerhalb der Zellen, berechnet werden.

Downshock-Puffer:

100 mM Mes/Tris pH 8
5 mM Na₂HPO₄
5 mM K₂HPO₄

Uptake-Puffer:

100 mM Mes/Tris pH 8
0,9 M NaCl
30 mM Glukose
30 mM Harnstoff
30 mM KCl

2.7.2 Bestimmung des Membranpotentials von *C. glutamicum*

Die Bestimmung des Membranpotentials wurde wie bereits beschrieben (Ebbighausen *et al.*, 1991) durchgeführt. Dabei wurde das lipophile und radioaktiv markierte Kation [¹⁴C]-Tetraphenylphosphoniumbromid (TPP⁺) (Hartmann Analytic) als Sonde verwendet (Kashket, 1985; Rottenberg, 1979). TPP⁺ ist in der Lage die Cytoplasmamembran zu durchdringen und in der Zelle zu akkumulieren. Dabei hängt die Akkumulation vom elektrischen Potential über der Membran ab und stoppt nach Einstellung eines Gleichgewichts. Im Gleichgewicht entspricht das elektrische Membranpotential somit dem chemischen Potential von TPP⁺ und das elektrische Potential kann auf Basis der intra- und extrazellulären Konzentration von TPP⁺ berechnet werden. Dabei gilt:

$$\Delta\Psi = (-2,303 R \cdot T/F) \log([TPP^+]_{in} / [TPP^+]_{ex})$$

mit

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

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

T = absolute Temperatur (K)

Um die Messung von unspezifischer Akkumulation von TPP⁺ an anionische Gruppen auf der Zelloberfläche und dem Zellinneren zu korrigieren wurden die Zellen mit einem Ionophorenmix aus Valinomycin (Endkonzentration 20 μM) und Nigericin (Endkonzentration 5 μM) deenergetisiert. Das Membranpotential wurde unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen bestimmt. In Abhängigkeit des Experiments wurden 10 μl einer TPP⁺-Gebrauchslösung (Endkonzentration 10 μM, spez. Aktivität der Gebrauchslösung: $2,21 \times 10^9$ D/min mmol, 2 μl/ ml Zellsuspension) auf 5 ml einer Zellsuspension mit einer OD₆₀₀ von 4 unter Rühren gegeben und Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten mittels Silikonölzentrifugation (200 μl Zellsuspension, 70 μl 1,09 g/cm³ Silikonöl und 30 μl 20% Perchlorsäure) vom Medium getrennt. Die Radioaktivität von 150 μl des Überstandes wurde per Flüssigkeitsszintillationszählung ermittelt. Zur Bestimmung der internen TPP⁺-Konzentration wurden außerdem 150 μl der Zellsuspension vermessen und so die interne TPP⁺-Konzentration berechnet:

$$TPP^+_{intern} = TPP^+_{total} - TPP^+_{extern}$$

Die erhaltenen Werte wurden um die unspezifische Bindung von TPP⁺ mittels Messung nach Zugabe von Nigericin und Valinomycin korrigiert.

2.7.3 Glutamatproduktion

Zur Produktion und Exkretion von Glutamat mit *C. glutamicum*, wurden Zellen 8 h in 25 ml BHI-Komplexmedium und 16 h in 50 ml CGXII-Minimalmedium vorkultiviert. Die Hauptkultur wurde dann auf eine OD₆₀₀ von 2 bis 3 in CGXII-Medium angeimpft und bei einer Temperatur von 30°C und 125 rpm inkubiert. Die Glutamataxkretion wurde in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ von 4-6 durch Zugabe von 6 U/ml Penicillin G (Sigma-Aldrich) ausgelöst. Zur Messung der Konzentration von Glutamat im Medium, wurde 1 ml der Hauptkultur entnommen und die Zellen mittels Zentrifugation (13000 rpm, 4°C) über 5 min sedimentiert. Ein Volumen von 500 µl des Überstandes wurde anschließend erneut bei 130000 rpm und 4°C über einen Zeitraum von 30 min zentrifugiert, um die Konzentration von Glutamat im Überstand mittels HPLC (2.6.2) zu bestimmen.

2.7.4 Aufschluss von *C. glutamicum* durch Permeabilisierung

Für den Aufschluss von Zellen mittels Permeabilisierung wurde CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) verwendet. Für den Nachweis und Messung der internen Glutamatkonzentration wurden Zellen sedimentiert, mit 1 ml 0,1% CTAB resuspendiert und über 20 min unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation über 15 min bei RT mit 13000 rpm, wurde der Überstand mittels HPLC analysiert.

2.7.5 Bestimmung der Zellviabilität von *E. coli* nach hypoosmotischem Schock

Die Bestimmung der Überlebensrate nach hypoosmotischem Schock erfolgte wie bereits zuvor beschrieben (Levina *et al.*, 1999; Nomura *et al.*, 2006). Zunächst erfolgte die Vorkultivierung von *E. coli* MJF612 mit entsprechendem Plasmid, bei denen vier Gene für mechanosensitive Kanäle deletiert sind in 5 ml CP-Minimalmedium mit einer Glukosekonzentration von 0,2 % und einer Temperatur von 37°C über ca. 16 h. Nach erneuter Zugabe von 0,2 % Glukose und Inkubation über 1,5 h erfolgte die Beimpfung einer Startkultur mit 10 ml CA-Minimalmedium, supplementiert mit 0,5 M NaCl (1120 osmol/kg) auf eine OD₆₀₀ von 0,02 mit den vorkultivierten Zellen. Nach Wachstum bis zur einer OD₆₀₀ von 0,13-0,14 erfolgte zur Plasmid-kodierten Expression der gewünschten Konstrukte, die Zugabe von IPTG auf eine Endkonzentration von 1 mM. Die Expression erfolgte über einen

Zeitraum von 1 h, um die Zellen anschließend einem hypoosmotischem Schock auszusetzen. Dazu wurden die Kulturen in 10 ml vorgewärmten CP-Minimalmedium 20-fach verdünnt und über 5 min bei 37°C und 125 rpm inkubiert. Als Kontrolle wurde CP-Minimalmedium mit 0,5 M NaCl äquivalent beimpft. Anschließend wurden alle Kulturen in drei Schritten insgesamt 200fach verdünnt und 15 µl der Zellsuspension auf LB-Agarplatten mit IPTG und entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Alle Verdünnungsschritte erfolgten dabei in CA-Minimalmedium mit unterschiedlicher NaCl-Konzentration, um eine Lösung mit CP-Minimalmedium und 0,5 M NaCl mit einer Osmolalität von 1120 mosmol/kg zu erhalten. Nach Inkubation über Nacht erfolgte die Zählung der Kolonie-formenden Einheiten sowohl der geschockten (N_{Schock}) als auch der ungeschockten ($N_{\text{Kontrolle}}$) Zellen, zur Berechnung der Überlebensrate ($N_{\text{Schock}}/N_{\text{Kontrolle}}$).

CP-Minimalmedium:

8,58 g/l Na₂HPO₄

0,87 g/l K₂HPO₄

1,34 g/l Zitronensäure

1 g/l (NH₄)₂SO₄

0,001 g/l Thiamin

0,1 g/l MgSO₄ 7H₂O

0,002 g/l (NH₄)₂SO₄FeSO₄ 6H₂O

pH 7, ~220 osmol/kg

2.8 Elektrophysiologische Messungen

2.8.1 Präparation von *E. coli* Sphäroplasten

Für die elektrophysiologische Messung von MscCG und Derivaten wurden Sphäroplasten aus *E. coli* MJF612, MJF465 und MJF431 erstellt, bei denen jeweils Gene für mechanosensitive Kanäle deletiert sind und zu untersuchende Kanäle Plasmid-kodiert exprimiert wurden. Die Methode der *patch-clamp*-Messung erfolgte ähnlich wie zuvor beschrieben (Martinac *et al.*, 1987; Ruthe und Adler, 1985). Zur Expression der gewünschten Kanäle wurde das Plasmid pQE60_ *lacI* mit Ampicillin-Resistenz konstruiert, da die Deletionsstämme keine Ampicillin-Resistenz besitzen. Eine Übernachtskultur (LB-Medium, 200 rpm, 37°C) von MJF612 oder den oben genannten *E. coli* mit entsprechenden

pQE60_ *lacI* Plasmid wurde in 20 ml über 16 h kultiviert und 200 µl für die Beimpfung von 20 ml Vorkultur verwendet. Nach Wachstum bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 wurde die Inkubation bei erhöhter Temperatur von 42°C fortgeführt. Von dieser Vorkultur wurden 6 ml verwendet um 54 ml LB-Medium mit 60 µg Cephalixin zu beimpfen. Anschließend erfolgte Inkubation und Wachstum der *E. coli*-Zellen bei 42°C über einen Zeitraum von 1-2 h, bis die Einzelzellfilamente die gewünschte Größe von ca. 50-15 µm erreichten, die ausreichend für die Formation von *giant*-Sphäroplasten (50-150 µm) ist. Nach Formation der verlängerten *E. coli* Zellen, erfolgte die Plasmid-kodierte Expression von MscCG oder Derivaten. Dazu wurden die Temperatur auf 25°C gesenkt und Glycerin mit einer Endkonzentration von 0,4% sowie IPTG mit einer Endkonzentration von 0,1 mM hinzugegeben. Zur Verringerung der Anzahl exprimierter Kanäle wurde in Abhängigkeit des Expressionslevels in einigen Präparationen die IPTG-Konzentration drastisch herabgesetzt. Die Expression erfolgte insgesamt über einen Zeitraum von 1,5-2 h bei 25°C und 180 rpm.

Die verlängerten Zellen wurden dann per Zentrifugation (5 min, 3500 rpm) geerntet und in 5 ml 0,8 M Sucrose mit 0,4% Glycerin resuspendiert, bevor sie nach erneuter Zentrifugation in 2,5 ml 0,8 M Sucrose mit 0,4% Glycerin aufgenommen wurden. Zur Bildung von Sphäroplasten wurden folgende Lösungen nacheinander hinzugefügt und durchmischt: 150 µl 1 M Tris pH 7,2, 120 µl 5 mg/ml Lysozym, 50 µl 5 mg/ml DNaseI und 150 µl 0,125 M EDTA (Endkonzentration 6,3 mM). Nach Zugabe von EDTA wurde die Formierung der Sphäroplasten durch Hydrolyse der Peptidoglycanschicht mikroskopisch verfolgt und die Reaktion zur Bildung der Sphäroplasten durch Zugabe einer Stopp-Lösung nach 3-7 min gestoppt. Die gebildeten Sphäroplasten wurden dann direkt in 5 ml Verdünnungslösung aufgenommen bei -20°C gelagert.

Stopp-Lösung:

2,1 ml 0,8 M Sucrose mit 0,4% Glycerin
228 µl A. dest
48 µl 1 M MgCl₂
24 µl 1 M Tris pH 7,2
1,2 µl Glycerin

Verdünnungslösung:

29 ml 0,8 M Sucrose mit 0,4% Glycerin
290 µl 1 M MgCl₂
290 µl 1 M Tris pH 7,2
2,3 µl Glycerin

2.8.2 Patch-Clamp-Messungen von *E. coli*-Sphäroplasten

Die elektrophysiologische Einzelzellmessung wurde unter anderem mit *giant-E. coli*-Sphäroplasten durchgeführt (Martinac *et al.*, 1987). Dazu wurden 1,5-3 μ l präparierter Sphäroplasten (2.8.1) in eine mit ca. 500 μ l Badlösung gefüllte Messkammer mit Glasboden gegeben. Zur Herstellung von Mikropipetten wurden Borosilikat-Kapillaren (Drummond Scientific) verwendet und mit einem Mikropipetten-Puller (Flaming/Brown P-87, Sutter Instruments Co. oder vertikalem Puller von Narishiger) mit einem Durchmesser von ca. 1 μ m gezogen, sodass der Widerstand der Mikropipette, je nach Zweck zwischen 1,5 und 6 M Ω lag. Die Glaspipetten wurden luftblasenfrei mit Pipettenlösung gefüllt. Alle Aufnahmen wurden nach Standard-patch-clamp-Technik (Hamill *et al.*, 1981) bei Raumtemperatur durchgeführt. Durch Ansaugen der Pipette mittels Spritze oder Mundstück wurde ein negativer Druck erzeugt, der zu einer dichten Versiegelung eines Membranfragments eines Sphäroplasten und der Glaspipette führt und so einem sehr hohem Widerstand erzeugt. Durch Erhöhung des Drucks und dem sehr vorsichtigem Entfernen des Sphäroplasten wird schließlich ein starke Versiegelung (*Giga-Ohm-Seal*) erreicht. Bei dieser Konfiguration handelt es sich um einen *Inside-Out-Patch*, bei dem sich die Innenseite des Membranpatches nach außen zeigt.

Der negative Druck wurde in mmHg gemessen und von einem piezoelektrischem Manometer (Omega Engineering) aufgenommen. Angelegte Spannungen und gemessene Ströme, die durch Aktivierung der mechanosensitiven Kanäle mittels Unterdruck hervorgerufen wurden, wurden mit einem Axon 1D *patch-clamp* Verstärker über einen Digital/Analog/Analog-Digital-Wandler, bei 2kHz digitalisiert und bei 5-20 kHz gefiltert, aufgenommen. Die Analyse der aufgenommenen Ströme erfolgte mittels pCLAMP10 Software (Axon Instruments), Leitfähigkeiten wurden unter Berücksichtigung der Gauß'schen Normalverteilung des Stroms bei jeweils angelegten Spannungen berechnet.

Pipettenlösung:

200 mM KCl
40 mM MgCl₂
5 mM HEPES
pH 7,2

Badlösung:

250 mM KCl
90 mM MgCl₂
5 mM HEPES
pH 7,2

2.8.3 Patch-Clamp-Messungen von Proteoliposomen

Zur elektrophysiologischen Vermessung mechanosensitiver Kanäle in Proteoliposomen wurden unterschiedliche Methoden zur Rekonstitution der isolierten Kanäle verwendet. Bei der D/R-Methode (Häse *et al.*, 1995) wurden 2 mg Lipide mit Chloroform in einem Reagenzglas gelöst und anschließend nach Zugabe von 1 ml D/R-Puffer 15 min im Ultraschallbad behandelt, bis sich die Lipide im Puffer homogen gelöst hatten. Diese Lösung wurde dann in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut 2 ml D/R-Puffer hinzugegeben. Nach Zugabe von zuvor aufgereinigten mechanosensitiven Kanälen im Verhältnis Lipid:Protein von 1:1000 erfolgte eine Inkubation unter Rotation über 1 h. Anschließend erfolgte die Zugabe von BioBeads (BioRad) und einer weitere Durchmischung über 3 h. Nach dem Entfernen der Biobeads wurde die Suspension mit 43.000 rpm 45 min bei 4°C zentrifugiert und 1-2 Tropfen des Sediments auf einen Objektträger getropft und dieses unter Vakuum bei 4°C getrocknet. Die getrocknete Schicht wurde dann durch Zugabe von D/R-Puffer rehydriert und sofort für die Messung verwendet. Durch Zugabe von 2-4 µl der rehydrierten Lipidlösung in eine Badlösung erfolgte die Formierung von multi- und unilaminaren Proteoliposomen.

Bei der Sucrose-Methode (Battle *et al.*, 2009) wurden 2 mg Lipide in Chloroform gelöst und unter Stickstoff getrocknet. Nach Zugabe von 1 ml 0,4 M Sucrose erfolgte eine Inkubation bei 55°C über 3 h. Anschließend erfolgte die Zugabe von isolierten mechanosensitiven Kanälen im Protein-Lipid-Verhältnis von 1:1000. Die Lösung wurde dann über Nacht bei RT mit 180 rpm inkubiert. 2 µl dieser Lipidmischung wurden dann in die Badlösung zur Bildung von Proteoliposomen gegeben.

Für die elektrophysiologische Messung der Kanalaktivitäten in Liposomen wurden Aliquots der präparierten Liposomenlösungen in eine Kammer mit Badlösung gegeben, was nach ca. 3-30 min zur Bildung von unilaminaren „blister“ führt. Diese wurden dann verwendet um eine starke Versiegelung zwischen Mikropipette und Membran zu erlangen (Giga-Ω-seal). Ein Inside-Out-Membran-patch konnte hier bereits durch Berührung der Pipettenspitze an die Membran erzeugt werden. Negativer Druck wurde mittels Spritze oder Mundstück erzeugt und per piezoelektrischem Manometer (Omega Engineering) in mmHg aufgenommen. Die Herstellung der Mikropipetten erfolgte wie oben beschrieben, wobei Pipetten erstellt wurden, deren Widerstand mit 2,5-5 MΩ etwas geringer war.

2.8.4 Bestimmung des Druckschwellenwerts von mechanosensitiven Kanälen

Zur Bestimmung des Druckschwellenwerts, der zur Öffnung von MscCG und Derivaten in Sphäroplasten führt, wurde der *E. coli* Stamm MJF431 verwendet, bei dem MscS und MscK, aber nicht MscL fehlt. MscL wird hier konstitutiv exprimiert und dient als Referenz zur Berechnung des Schwellenwerts. Die Präparation und Plasmid-kodierte Expression von MscCG und Derivaten erfolgte wie beschrieben (2.8.1). Bei der Analyse wurde der Druck gemessen, bei dem die erste Öffnung von MscCG bzw. einem Derivat und im Vergleich dazu MscL zu beobachten war. In jedem *patch* wurde die Messung mindestens fünf Mal durchgeführt und insgesamt mit mindestens fünf Replikaten wiederholt, um das Druckschwellenverhältnis von MscCG zu MscL und damit den benötigten negativen Druck, der zum Öffnen der Kanäle führt, zu berechnen.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Funktion von MscCG in der Glutamatexkretion

3.1.1 Konstruktion von GOF- und LOF-Mutanten von MscCG

Die Deletion von *mscCG* hat eine drastische Verringerung der durch Penicillin-ausgelösten Glutamatexkretion zur Folge (Börngen, 2009). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass MscCG als Exkretionssystem fungiert und neben seiner Funktion als mechanosensitiven Kanal sowohl als Notventil nach hypoosmotischem Schock, als auch als Exkretionssystem für Glutamat fungiert. Da durch die Deletion nicht eindeutig geklärt werden konnte ob MscCG nicht auch eine regulatorische Funktion auf ein unbekanntes Protein hat, das die Exkretion vermittelt, könnten Funktionsgewinn *gain-of-function*- (Funktionsgewinn) als auch *loss-of-function*- (Funktionsverlust) Mutationen eine direkte Exkretion via MscCG offenlegen. Für MscS, der eine große Ähnlichkeiten mit der Porenregion von MscCG aufweist, sind einige GOF- als auch LOF-Mutationen bekannt, bei denen eine Substitution von Aminosäuren in funktionellen Untereinheiten zu drastischen Veränderungen im *gating*-Verhalten führen. So resultieren Modifikationen in einem Glycin-Alanin reichem Motiv des hydrophoben Verschlusses der Pore, zur Verringerung des für die Öffnung benötigten Drucks (Edwards *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2003a). Im Gegensatz dazu wurden für MscS außerdem Mutationen beschrieben, die zu einem *loss-of-function* führen. So evoziert eine Substitution von hydrophoben Resten der Lipid-Protein-Verbindung durch hydrophile Aminosäuren wie Asparagin eine Veränderung der Interaktion und somit einer erhöhten Druckschwelle zur Öffnung von MscS. Diese Bereiche befinden sich an den Enden der ersten sowie zweiten Transmembranhelix von MscS (Nomura *et al.*, 2008, 2006).

Ein LOF-Phänotyp war dabei nur zu beobachten, wenn die Doppelmutationen A51N(TM1)/F68N(TM2) und I37N(TM1)/L86N(TM2) auf der jeweils selben Seite des cytoplasmatischen bzw. periplasmatischen Endes vorhanden waren. Die Asparagin-Substitution der Aminosäuren in der Nähe der Enden der Transmembrandomänen resultierte in einer Erhöhung der *gating*-Druckschwelle, sowie in der Verringerung der Überlebensrate nach hypoosmotischem Schock. Es wird vermutet, dass die Verkürzung der hydrophoben Region, durch Substitution von hydrophoben Resten am Ende der Transmembranhelices durch Asparagin, zur einer reduzierten Spannungssensitivität führt. Auch kommt es aufgrund einer Asparagin-Substitution zu einer Strukturveränderung des Proteins, die eine Lipid-

Protein-Interaktion an den Enden von TM1 und TM2 für die Funktion von MscS und zur Detektion von Veränderungen der Membranspannungen notwendig ist, verhindert (Nomura *et al.*, 2006).

Des Weiteren wurden im Jahr 2010 Aminosäuren identifiziert, deren polare Substitution durch Serin zu einem substantiellen Verlust der Überlebensrate bei osmotischen Schock führt (Belyy *et al.*, 2010). Multiple Serin-Substitutionen (F68S, L111S und L115S) führten sogar zu einem Phänotyp der dem *knock-out* von MscS ähnelt. Die Orte der Substitution sind stark konserviert, formen den Rand der verdeckten interhelikalen Kontaktstellen und repräsentieren die Spannungs-übermittelnde Klammer in MscS.

Im Gegensatz zu MscS, dessen Struktur sowohl im offenem (2vv5.pdb), (Wang *et al.*, 2008) als auch im geschlossenen Zustand (2oau.pdb) (Bass *et al.*, 2002) bekannt ist, sind bisher keine Strukturinformationen für MscCG verfügbar. Ein Vergleich der Primärstruktur von MscS und MscCG verdeutlicht, dass beide Kanäle hohe Ähnlichkeiten, insbesondere in der Poren-formenden dritten Transmembrandomäne besitzen (Abb. 5). Diese Pore-formende Helix besitzt eine äußerst hoch konserviertes Motiv (G(X)₂G(X)₃GLAXQ(X)₄N(X)₃G(X)₅) und nimmt eine wichtige Rolle in der Funktion des Kanals ein (Akitake *et al.*, 2007; Balleza und Gómez-Lagunas, 2009; Edwards *et al.*, 2005).

Ergebnisse

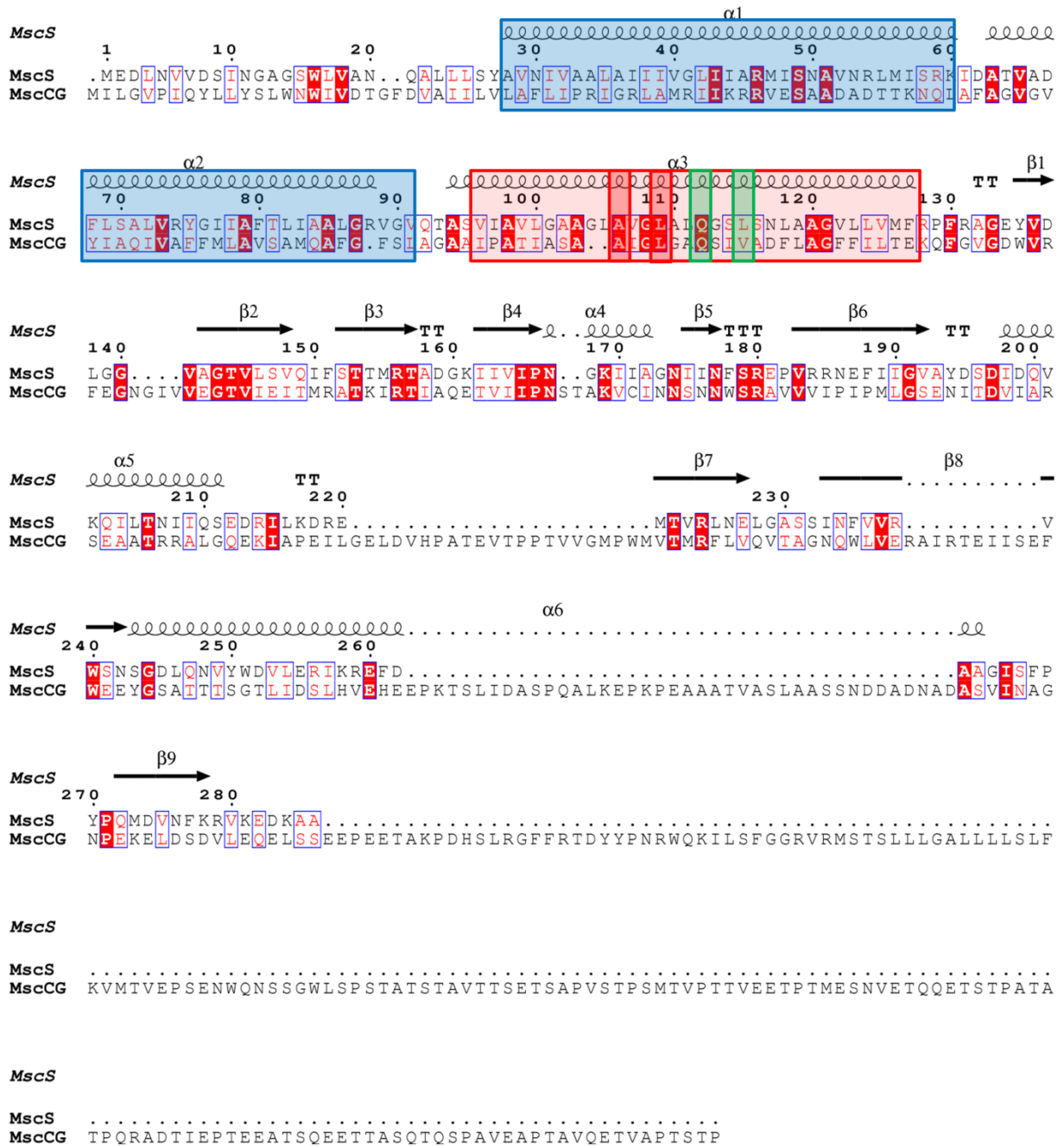


Abb. 5: Sequenzvergleich der Primärstruktur von *E. coli* MscS mit Sekundärstrukturinformationen und *C. glutamicum* MscCG. Hervorgehoben sind die ersten drei Transmembrandomänen, sowie Aminosäuren, deren Substitution zu GOF und LOF in MscCG führten und äquivalente Aminosäuren in MscS. **GOF: A106 und L109; **LOF:** Q112 und V115.**

Zur Identifikation möglicher GOF- und LOF-Mutationsbereiche in MscCG wurde neben dem Sequenzvergleich auch eine Modellierung durchgeführt um entsprechende Aminosäuren auch in einer möglichen Struktur zu identifizieren. Dafür wurde zunächst das Programm Swissmodell Workspace (Arnold *et al.*, 2006) verwendet, bei dem mithilfe eines Sequenzvergleichs und der bekannten Struktur von MscS (2oau.pdb) ein Homologiemodell erstellt werden konnte (Abb. 6).

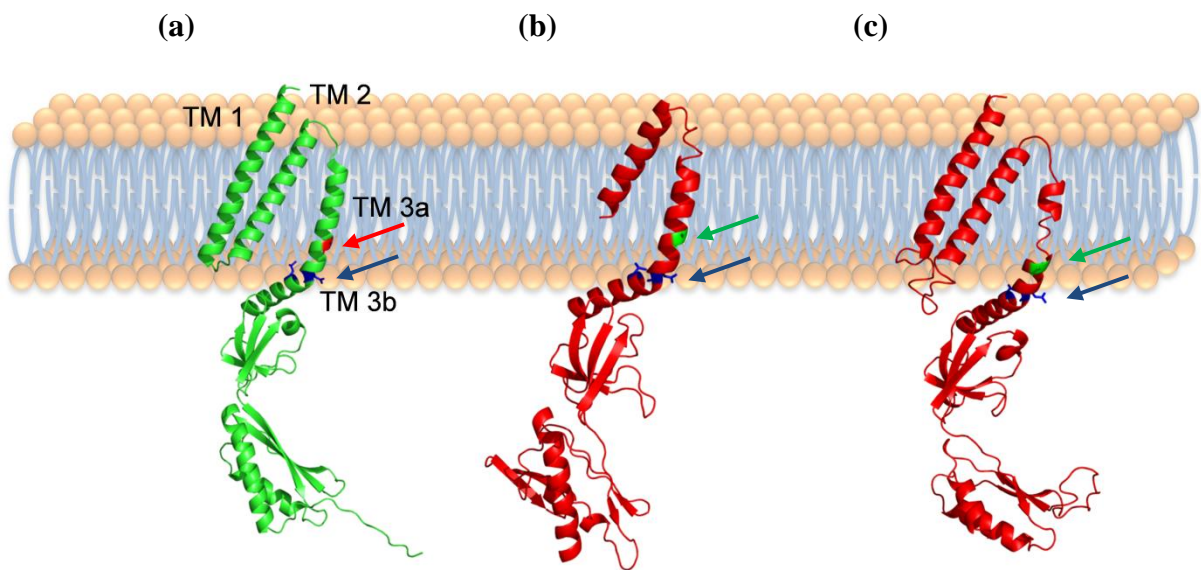


Abb. 6: Homologiemodelle von MscCG auf der Basis von MscS. Die Modellierung von MscCG erfolgte mittels Swissmodel Workspace (c) und modeler (b) auf Basis von MscS (a) (2oau.pdb). Zur Modellierung der ersten und zweiten Transmembrandomäne wurde die Aminosäuresequenz von MscS und MscCG angepasst um diese, trotz geringer Ähnlichkeit, zu modellieren. Die zusätzliche C-terminale Domäne wurde aufgrund fehlender Vergleichsstrukturen nicht modelliert. Indiziert sind Aminosäuren, deren Substitution in MscS und MscCG zu *gain-of-function* oder *loss-of-function* führten. MscS: **GOF: A106**, **LOF: Q112, L115**; MscCG: **GOF: A106**, **LOF: Q112, V115**.

Aufgrund der geringen Homologie der ersten Transmembrandomäne wurde außerdem ein Sequenzvergleich durchgeführt, bei dem 26 N-terminale Aminosäuren von MscCG unberücksichtigt blieben. Mithilfe einer erneuten Sequenzanalyse mit „T-COFFEE“ (Notredame *et al.*, 2000), der Sequenz von Aminosäuren 26-280 unter Zuhilfenahme der Software „modeller“ (Eswar *et al.*, 2001) konnten 20 putative Strukturen identifiziert werden, in denen nach Überprüfung der Parameter „consistency of coordinates“ und „3-D-Structure Evaluation“ das wahrscheinlichste Modell mit erster und zweiter Transmembrandomäne modelliert werden konnte.

Unter Berücksichtigung sowohl der Sequenzanalyse, als auch der Homologiemodelle wurden äquivalente Aminosäuren identifiziert, von denen putative GOF-Mutationen ausschließlich in der dritten Transmembrandomäne lokalisiert sind (Tab. 4 und Tab. 5).

Tab. 4: GOF-Mutationen in MscS und äquivalente Mutationen nach Struktur- und Sequenzanalyse in MscCG

GOF-Mutation in MscS	Referenz	Äquivalente Mutation in MscCG
A106V (TM3)	(Edwards <i>et al.</i> , 2005)	A106V
L109C (TM3)	(Edwards <i>et al.</i> , 2005)	L109C
A102P (TM3)	(Miller <i>et al.</i> , 2003a)	A105P

Tab. 5: LOF-Mutationen in MscS und äquivalente Mutationen nach Struktur- und Sequenzanalyse in MscCG

LOF-Mutationen in MscS	Referenz	Äquivalente Mutation in MscCG
I37N (TM1) / L86N (TM2)	(Nomura <i>et al.</i> , 2006)	L31N /L93N; F78N/I45N; F78N/I46N; F79N/I45N; F79N/I46N; L41N/M86N
A51N (TM1) / F86N (TM2)	(Nomura <i>et al.</i> , 2006)	A51N/ I72N oder V70N
F68S (TM2)	(Belyy <i>et al.</i> , 2010)	I75S
L111S (TM3)	(Belyy <i>et al.</i> , 2010)	I107S
L115S (TM3)	(Belyy <i>et al.</i> , 2010)	V115S

3.1.2 Charakterisierung von GOF- und LOF Mutationen in MscCG

Die Charakterisierung der Glutamatexkretion nach Plasmid-kodierter Expression der Konstrukte mit putativen GOF- und LOF-Mutationen im Deletionsstamm *C. glutamicum* Δ mscCG erfolgte durch Zugabe von 6 U/ml Penicillin in der exponentiellen Wachstumsphase.

Die Expression von MscCG-His mit den Mutationen A106V und L109C führte zu einer GOF-phänotypischen Veränderung. So führte die Induktion der Expression mit 25 μ M IPTG des GOF-Konstrukts MscCG_A106V-His im Vergleich zur Expression von mit MscCG-His und dem WT zu einem deutlich verringerten Wachstum (Abb. 9).

Zudem wurde bereits vor Zugabe von Penicillin eine konstitutive Exkretion von Glutamat beobachtet, die durch Zugabe von Penicillin verstärkt wurde (Abb. 9). So betrug die initiale Exkretionsrate in den ersten drei Stunden $28,0 \pm 1,3 \mu\text{mol g ZTM}^{-1} \text{min}^{-1}$. Auch die massive Expression von MscCG-His führte zu einer spontanen Exkretion von Glutamat, die im Gegensatz zu MscCG_A106V-His nach drei Stunden jedoch deutlich stagnierte und mit einer initialen Exkretionsrate von $11,3 \pm 0,4 \mu\text{mol g ZTM}^{-1} \text{min}^{-1}$ außerdem deutlich geringer war.

Die massive Glutamatexkretion ohne Zugabe von Penicillin ging mit einem deutlich verringerten Wachstum einher, während die massive Expression von MscCG-His keinen Einfluss auf das Wachstum hatte. Die mittels Penicillin ausgelöste Glutamatexkretion verstärkte den spontanen Efflux nach Expression von MscCG-His, als auch MscCG_A106V-His (Abb. 9, Tab. 6).

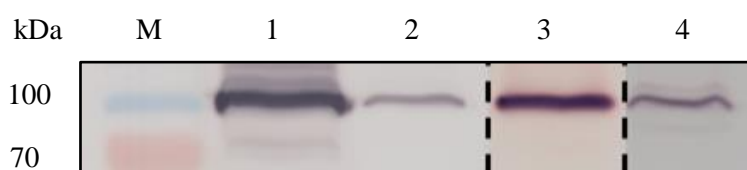


Abb. 7: Western Blot-Analyse von MscCG-His und MscCG_A106V-His. Die Expression von MscCG-His und MscCG_A106V-His erfolgte Plasmid-kodiert unter Verwendung von 25 μ M IPTG in *C. glutamicum* Δ mscCG. Zur Verringerung der Expression erfolgte keine Zugabe von IPTG. Für die SDS-PAGE wurden jeweils 25 μ g Membranextrakt verwendet. Die immunologische Entwicklung erfolgte mittels Anti-Penta-His-Antikörper. Größenstandard (M); MscCG-His + IPTG (1), MscCG-His ohne IPTG (2), MscCG_A106V-His + IPTG (3) und MscCG_A106V-His ohne IPTG (4).

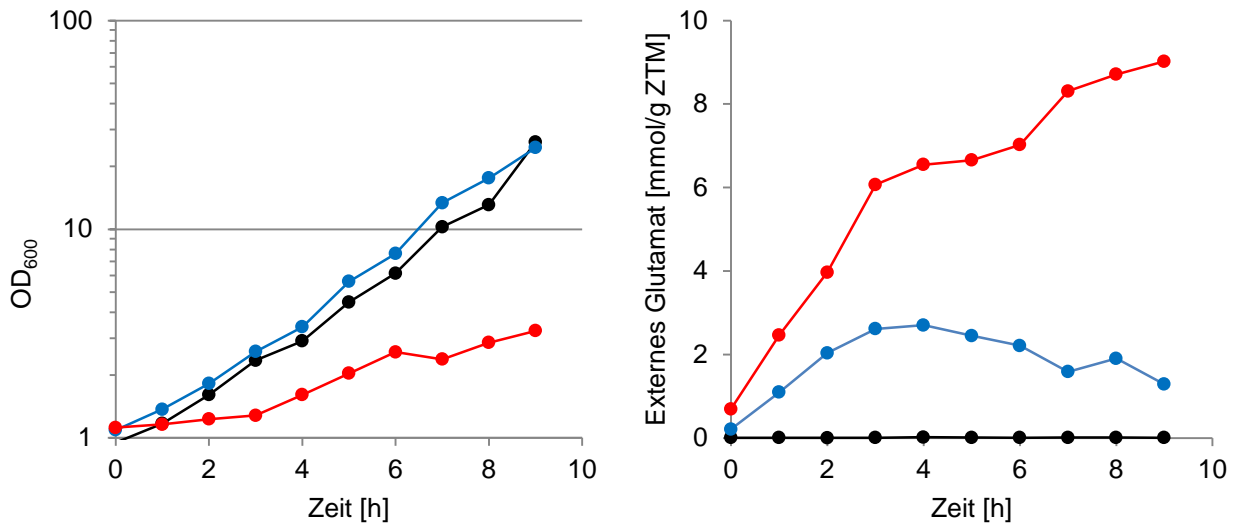


Abb. 8: Wachstum von *C. glutamicum* ATCC 13032 WT, sowie *C. glutamicum* *AmscCG* nach Expression von MscCG -His und MscCG_A106V-His und deren Glutamatefflux. Dargestellt ist die Zunahme der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm in CGXII-Medium (a). Es erfolgte keine Auslösung der Glutamatexkretion mittels Penicillin. Die Plasmid-kodierte Expression von MscCG-His und MscCG_A106V-His erfolgte durch Zugabe von 25 μ M IPTG. Externes Glutamat wurde mittels HPLC-Analyse gemessen (b). WT (●), MscCG-His (●) und MscCG_A106V-His (GOF) (●).

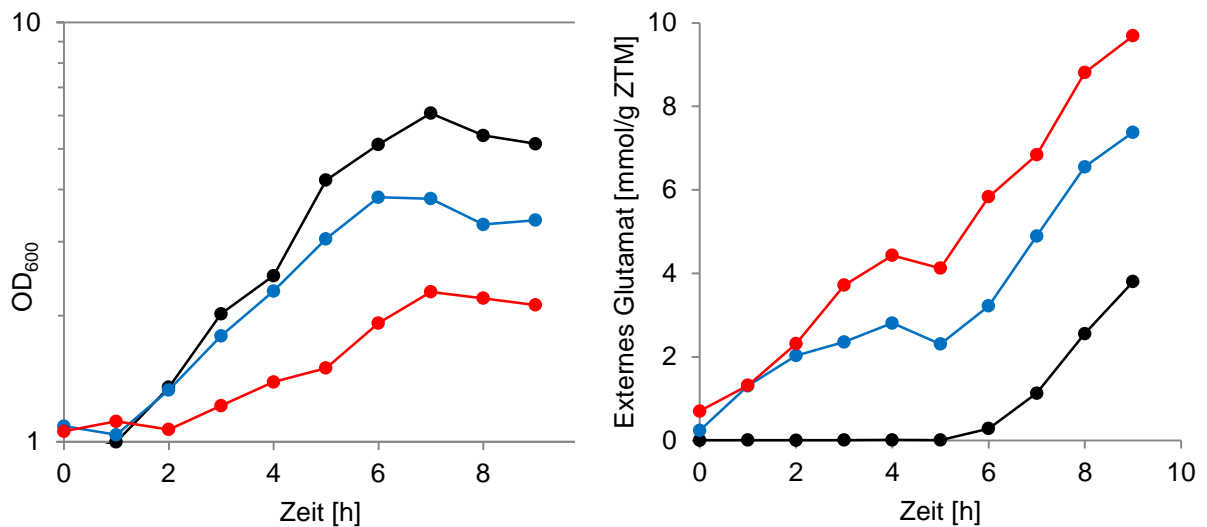


Abb. 9: Wachstum von *C. glutamicum* ATCC 13032 WT, sowie *C. glutamicum* *AmscCG* nach Expression von MscCG -His und MscCG_A106V-His und deren Glutamatefflux nach Zugabe von Penicillin. Dargestellt ist die Zunahme der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm in CGXII-Medium. Die Auslösung der Glutamatexkretion erfolgte durch Zugabe von 6 U/ml Penicillin G nach 3 h (Pfeil). Die Plasmid-kodierte Expression von MscCG -His und MscCG_A106V-His erfolgte durch Zugabe von 25 μ M IPTG. Die Konzentration externen Glutamats wurde mittels HPLC-Analyse bestimmt. WT (●), MscCG-His (●) und MscCG_A106V-His (GOF) (●).

Tab. 6: Glutamatexkretionsraten von MscCG-His und MscCG_A106V-His bei Expression mit 25 μ M IPTG. Die Glutamatexkretionsraten wurden mittels linearer Regression der externen Glutamatkonzentrationen bis 3 h , sowie nach Zugabe von Penicillin G ermittelt. Die Expression der Konstrukte erfolgte unter Verwendung von 25 μ M IPTG. $n \geq 3$

Stamm/ Konstrukt	Glutamatexkretionsrate [μ mol g ZTM ⁻¹ min ⁻¹]	
	ohne Penicillin	mit Penicillin
MscCG-His (0-3 h)	11,3 \pm 0,4	-
MscCG_A106V-His (0-3 h)	28,0 \pm 1,3	-
MscCG-His (3-9 h)*	-	17,6 \pm 2,8
MscCG_A106V-His (3-9 h)*	-	22,0 \pm 3,0
WT	0	16,9 \pm 1,1
Δ mscCG	0	3,4 \pm 0,1

* Die Zugabe von Penicillin erfolgte nach 3 h

Prokaryoten sind in der Lage sich hyperosmotischen Bedingungen mittels Aufnahme und Synthese, also der Akkumulation von kompatiblen Soluten anzupassen, um den Zellturgor aufrecht zu erhalten. So sind Bakterien in der Lage ihren Zellturgor mittels Aufnahme und Efflux von Soluten exakt einzustellen (Grammann *et al.*, 2002). Kürzlich wurde gezeigt, dass MscCG eine Rolle bei der Feineinstellung der internen *steady-state* Solutakkumulation in *C. glutamicum* spielt (Börngen *et al.*, 2010). Es wird davon ausgegangen, dass MscCG mit passiven Efflux und der Betain/Na⁺-Symporter BetP mit aktiver Aufnahme von Betain zusammen regulieren und dessen Konzentration justieren. Zur Messung von Akkumulation und Efflux unter hyperosmotischen Bedingungen, wurde während der Aufnahme von radioaktiv markiertem Betain ein Überschuss unmarkierten Betains appliziert. In Abhängigkeit des Expressionslevels von MscCG wurde ein Efflux durch Verringerung der internen Konzentration markierten Betains beobachtet. Es wird davon ausgegangen, dass der Betainefflux während der Betainakkumulation direkt mit der Anwesenheit von MscCG korreliert (Börngen, 2009). Folglich wurde der Einfluss der GOF-Mutation A106V in MscCG auf die Betainakkumulation analysiert. Die Vorkultivierung und Betainaufnahme erfolgte unter hyperosmotischen Bedingungen mit einem vorausgehendem hypoosmotischem Schock.

Da das Expressionslevel von MscCG-His einen deutlichen Einfluss auf den Glutamatefflux hatte, wurde durch Verzicht auf IPTG das Expressionslevel beider Kanäle reduziert. So konnte ein Einfluss des Expressionslevels bei der Betainakkumulation festgestellt werden. Stämme mit einem moderaten Expressionslevel von MscCG-His (ohne IPTG) zeigten eine

mit dem Wildtyp vergleichbare Betainakkumulation (Abb. 10). Die sehr starke Expression von MscCG-His (25 μ M IPTG) führte zu einer verringerten Netto-Akkumulation, die insgesamt wahrscheinlich auf den verstärkten Efflux aufgrund einer erhöhten Anzahl von Kanälen zurückzuführen ist.

Die stark erhöhte Expression des GOF-Konstrukts MscCG_A106V-His (25 μ M IPTG) führte zur einer deutlich verminderten Fähigkeit, Betain zu akkumulieren. Dies wird insbesondere im Vergleich zur Betainakkumulation nach übermäßig starker Expression von MscCG-His deutlich (Abb. 10). Auch die Anwesenheit eines moderat exprimierten Konstrukts mit der GOF-Mutation A106V führte maximal zur halben Menge akkumulierten Betains im Vergleich zum Wildtyp und der Komplementante bei moderater Expression. Außerdem war der Efflux durch die GOF-Mutation derart verstärkt, dass bereits zehn Minuten nach Zugabe eines Überschusses unmarkierten Betains nahezu kein internes, markiertes Betain mehr detektiert werden konnte (Abb. 10). Diese Beobachtung verdeutlicht, dass die eingeführte GOF-Mutation A106V nicht nur für einen konstitutiven Glutamatefflux verantwortlich ist, sondern nach hypoosmotischem Schock einen derart starken Efflux von Betain unter hyperosmotischen Bedingungen verursacht, dass dieser in einer verringerten *steady-state* Betainakkumulation resultiert.

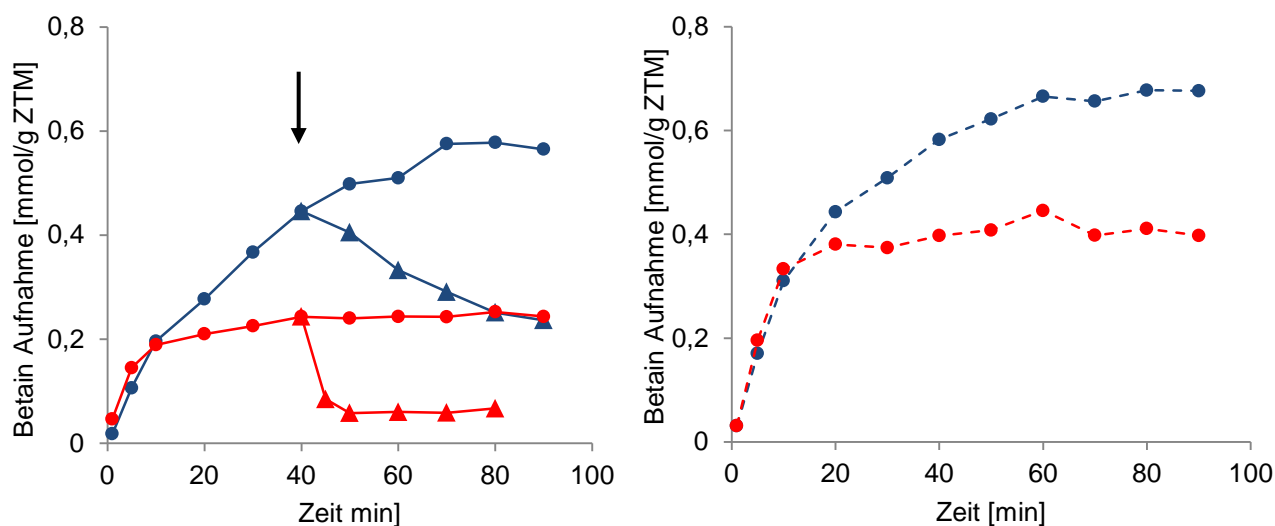


Abb. 10: Betainakkumulation und Efflux unter hyperosmotischen Bedingungen. Die Betainakkumulation erfolgte unter hyperosmotischen Bedingungen nach hypoosmotischem Schock. Die Menge radioaktiv markierten Betains im Cytoplasma wurde mit schneller Filtration ermittelt. Die Zugabe eines Überschusses (50 mM) unmarkierten Betains (*chase*) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die moderate, Plasmid-kodierte Expression in *C. glutamicum* Δ mscCG erfolgte ohne Zugabe von IPTG (gestrichelte Linien), die starke Expression erfolgte durch Induktion mit 25 μ M IPTG. MscCG-His (●) nach *chase* (▲), MscCG_A106V-His (●) nach *chase* (▲).

Mutationen an den Enden der ersten und zweiten Transmembrandomäne von MscCG, die den LOF-Mutationen in MscS entsprechen, konnten für MscCG nicht identifiziert werden. Keine der eingefügten Doppelmutationen führte zu einem LOF-Phänotyp. Die geringe Ähnlichkeit, insbesondere der ersten Transmembrandomäne, lassen andere Protein-Lipid-Interaktionsstellen vermuten. Die Expression der zu MscS äquivalenten LOF-Mutationen in der dritten Transmembrandomäne zeigte jedoch ein abweichendes Bild.

So führte die Substitution von Glutamin112 mit Leucin und Valin115 mit Serin in der Porenformenden Domäne von MscCG und die Expression des Konstrukts in *C. glutamicum* Δ mscCG zu einer drastischen Reduktion des durch Penicillin ausgelösten Glutamatefflux auf das Niveau der Deletionsmutante *C. glutamicum* Δ mscCG (Abb. 12). So lag die in der exponentiellen Wachstumsphase ausgelöste Glutamatexkretion der Deletionsmutante bei $3,4 \pm 0,1 \mu\text{mol g ZTM}^{-1} \text{min}^{-1}$, während die Exkretionsrate nach Expression des LOF-Konstrukts MscCG_Q112L_V115S-His einen Wert von $3,7 \pm 0,2 \mu\text{mol g ZTM}^{-1} \text{min}^{-1}$ aufwies (Tab. 7).

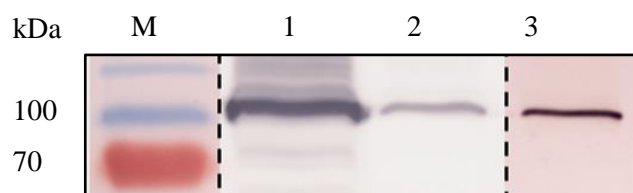


Abb. 11: Western Blot-Analyse von MscCG-His und MscCG_Q112L_V115S-His. Die Expression von MscCG Δ 397-405-His und MscCG_Ala397-405-His erfolgte Plasmid-kodiert unter Verwendung von 25 μM IPTG in *C. glutamicum* Δ mscCG. Zur Verringerung der Expression erfolgte keine Zugabe von IPTG. Für die SDS-PAGE wurden jeweils 25 μg Membranextrakt verwendet. Die immunologische Detektion erfolgte mittels Anti-Penta-His-Antikörper. Größenstandard (M); MscCG-His + IPTG (1), MscCG-His ohne IPTG (2) und MscCG_Q112L_V115S-His + IPTG.

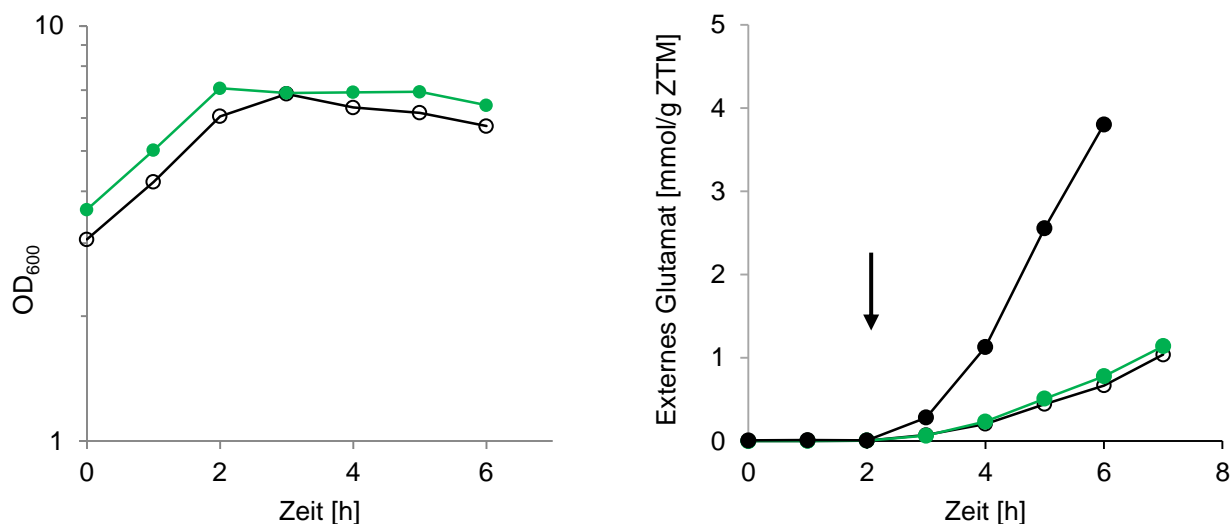


Abb. 12: Wachstum von *C. glutamicum* $\Delta mcsCG$ sowie Glutamatefflux nach Expression von MscCG_Q112L_V115S-His (LOF) und Zugabe von Penicillin. Dargestellt ist die Zunahme der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm in CGXII-Medium (a). Nach 2 h erfolgte die Zugabe von 6 U/ml Penicillin G zum Auslösen der Glutamatexkretion (b). Die Plasmid-kodierte Expression von MscCG_Q112L_V115S-His erfolgte durch Zugabe von 25 μ M IPTG. Die Konzentration externen Glutamats wurde mittels HPLC-Analyse bestimmt. WT (●), $\Delta mcsCG$ (○) und MscCG_Q112L_V115S-His (●).

Tab. 7: Glutamatexkretionsraten von Deletionsmutante und LOF-Konstrukt. Die Glutamatexkretionsraten wurden mittels linearer Regression der externen Glutamatkonzentrationen nach Zugabe von 6 U/ml Penicillin G ermittelt. Die Expression des LOF-Konstrukts erfolgte unter Verwendung von 25 μ M IPTG. n = 3

Stamm/ Konstrukt	Glutamatexkretionsrate [μ mol g ZTM ⁻¹ min ⁻¹]	
	ohne Penicillin	mit Penicillin
$\Delta mcsCG$	0	3,41 \pm 0,12
MscCG_Q112L_V115S-His	0	3,73 \pm 0,23
WT	0	16,9 \pm 1,1

Die Expression des LOF-Konstrukts unter hyperosmotischen Bedingungen mit vorausgehendem hypoosmotischem Schock resultiert in einer Akkumulationskinetik, die der Deletionsmutante entspricht. In beiden Fällen wurde eine deutlich verlangsamte Betainakkumulation im Vergleich zum Wildtyp oder nach Komplementation beobachtet (Abb. 13). Aufgrund der Abwesenheit von MscCG, kann davon ausgegangen werden, dass diese Zellen nach dem hypoosmotischem Schock kaum kompatible Solute exkretierten und demnach diese unter hyperosmotischen Bedingungen weniger schnell akkumulieren. Die

Akkumulation bis zu einer Konzentration von annähernd 0,8 mmol/g ZTM, wurde erst nach einem Zeitraum von 90 min erreicht. Die Zugabe eines Überschusses unmarkierten Betains, hatte keinen Einfluss auf die cytoplasmatische, bis dahin aufgenommene Betainkonzentration der Deletionsmutante und blieb annähernd konstant. Die Expression von MscCG_Q112L_V115S-His führte zu einem ähnlichem Ergebnis (Abb. 13). Ein unter diesen Bedingungen typischer Efflux konnte in beiden Fällen also nicht beobachtet werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass trotz der Expression von MscCG_Q112L_V115S-His kein Betain unter hypoosmotischen Bedingungen exkretiert wird und so die Feinabstimmung der internen Betainkonzentration im Zusammenspiel mit der aktiven Aufnahme von BetP gestört ist. Außerdem konnte keine signifikante Änderung des Membranpotentials nach hypoosmotischem Schock festgestellt werden. Dieses betrug nach Expression des LOF-Konstrukts 208 mV und unterschied sich von dem der Deletionsmutante (217 mV) kaum.

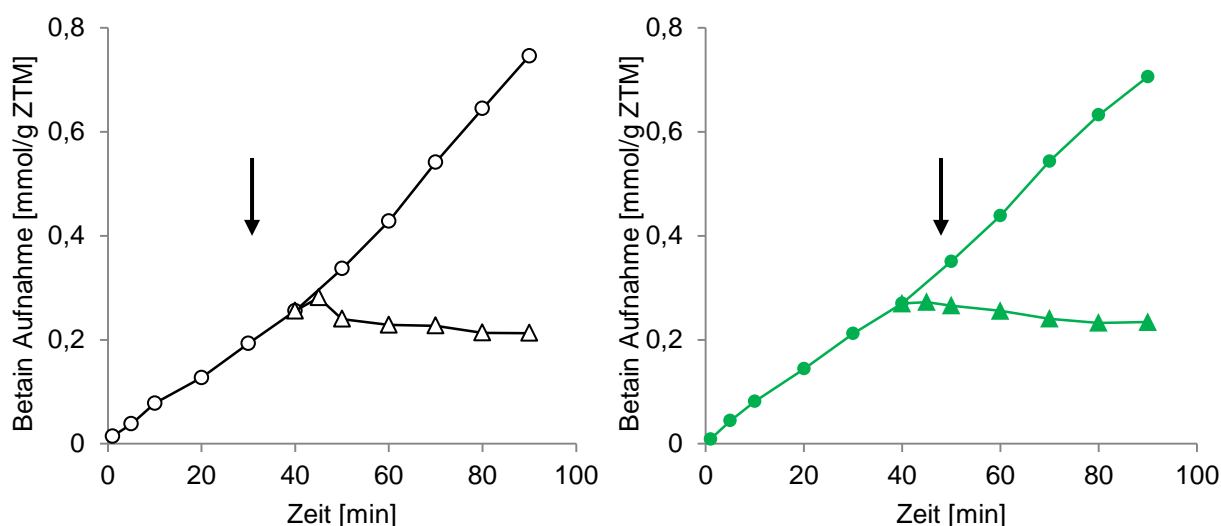


Abb. 13: Betainakkumulation unter hyperosmotischen Bedingungen. Die Betainakkumulation erfolgte unter hyperosmotischen Bedingungen, nach hypoosmotischem Schock. Die Menge radioaktiv markierten Betains im Cytoplasma wurde mit schneller Filtration ermittelt. Die Zugabe eines Überschusses unmarkierten Betains (*chase*) erfolgte nach 40 min (Pfeil). Die Plasmid-kodierte Expression von MscCG_Q112L_V115S-His in *C. glutamicum* Δ mscCG erfolgte durch Zugabe von 25 μ M IPTG. Δ mscCG (○) nach *chase* (△), MscCG_Q112L_V115S-His (●) nach *chase* (▲).

Eine übliche Methode zur Charakterisierung der Mechanosensitivität von mechanosensitiven Kanälen ist die Berechnung des Druckschwellenwertes, der für die erste mechanische Öffnung eines Kanals im *patch* durch erhöhte Membranspannung benötigt wird (Blount und Moe, 1999; Blount *et al.*, 1996). Dieser Druckschwellenwert wurde hier mittels Unterdruck, der auf die *Patch*-Pipette geleitet wurde und eine Membranspannung erzeugt, ermittelt. Da sich der für das *gating* von MscCG durch Dehnung der Lipiddoppelschicht der *E. coli*

Sphäroplasten benötigte Druck in jedem Versuch leicht unterscheidet, wurde der konstitutiv exprimierte MscL zur Berechnung des Druckverhältnisses verwendet.

Tatsächlich wurde für die Öffnung und damit Aktivierung des LOF-Konstrukts MscCG_Q112L_V115S ein deutlich höherer Druck, als zur Öffnung des ersten MscCG-Kanals benötigt (Abb. 14). Die eingefügten Mutationen, die zu einer Verringerung des durch Penicillin ausgelösten Glutamatefflux führen, spiegeln sich somit auch in einen deutlichen Anstieg des *gating*-Schwellenwerts wider.

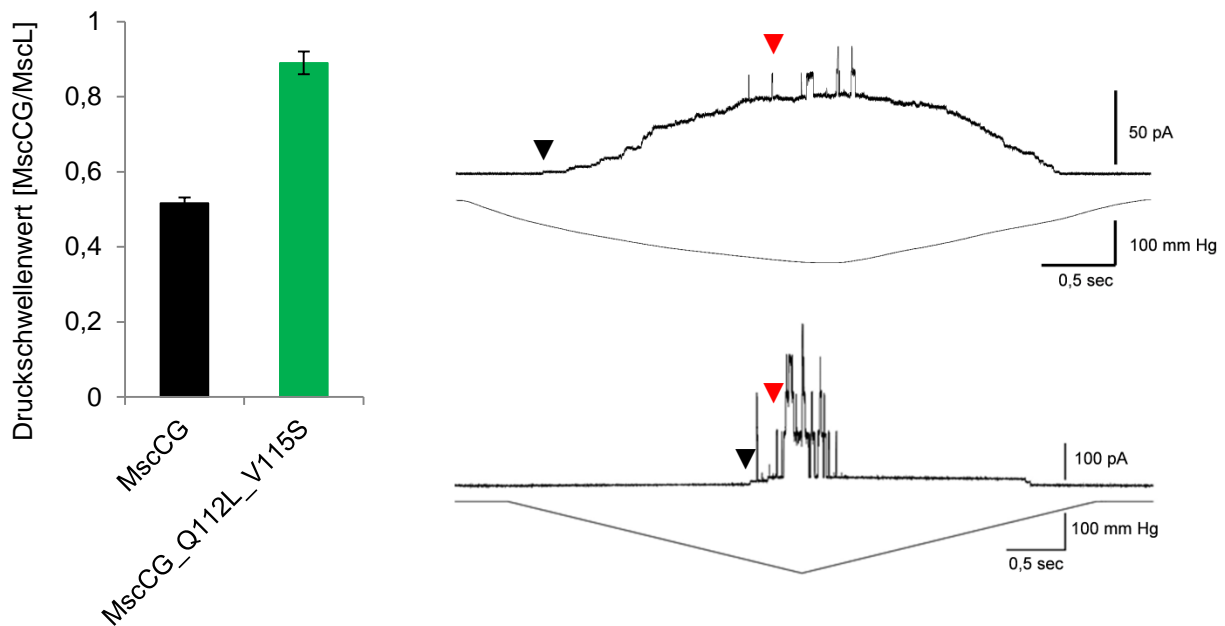


Abb. 14: Kanalaktivität und Druckschwellenwert von MscCG und MscCG_Q112L_V115S in *E. coli* MJF 431 Sphäroplasten im Vergleich zu MscL. Patch-Clamp Aufnahmen der Kanalaktivitäten erfolgten bei einer Spannung von +30 mV an *E. coli* MJF431 Sphäroplasten nach Plasmid-kodierter Expression von MscCG (oben) und MscCG_Q112L_V115S (unten), unter asymmetrischen Pufferbedingungen. Dargestellt sind die Stromspur und der angelegte Druck in der Pipette. MscCG-Aktivität kann bei deutlich geringerem Druck im Vergleich zu MscL beobachtet werden. Die Pfeile repräsentieren die erste Öffnung von MscCG, sowie MscCG_Q112L_V115S (▼) und MscL (▼). Druckschwellenwerte im relativen Verhältnis zu MscL dargestellt (Mittelwert \pm Standardfehler. $n > 5$).

Zur Überprüfung dieser Schwellenwertveränderung *in vivo* wurden außerdem Überlebens-tests mit *E. coli* MJF 612 ($\Delta mscK$, $\Delta mscL$, $\Delta mscS$, $\Delta mscM$) nach heterologer Expression von MscCG und MscCG_Q112L_V115S durchgeführt. Untersuchungen mit MscS-Mutanten hatten zuvor gezeigt, dass ein Anstieg des Druckschwellenwerts mit einer Verringerung der Überlebensrate einhergeht (Belyy *et al.*, 2010; Nomura *et al.*, 2006). Nach Expression von MscCG oder MscCG_Q112L_V115S in *E. coli* MJF 612 wurden Zellen

hypoosmotisch geschockt und die Überlebensrate in Relation zu nicht geschockten Zellen bestimmt (Abb. 15).

Die herterologe Expression von MscCG war nicht in der Lage den hypoosmotischen Schock vollständig zu kompensieren. So lag die Überlebensrate von *E. coli* MJF612 Zellen mit MscCG bei $40,49 \pm 0,3$ %. Die Expression von MscCG mit eingefügten LOF Mutationen Q112L und V115S verringerten die Überlebensrate auf $24,8 \pm 2,5$ %, die annähernd der Überlebensrate von *E. coli* MJF612 mit Leerplasmid entspricht ($21,1 \pm 3,1$ %).

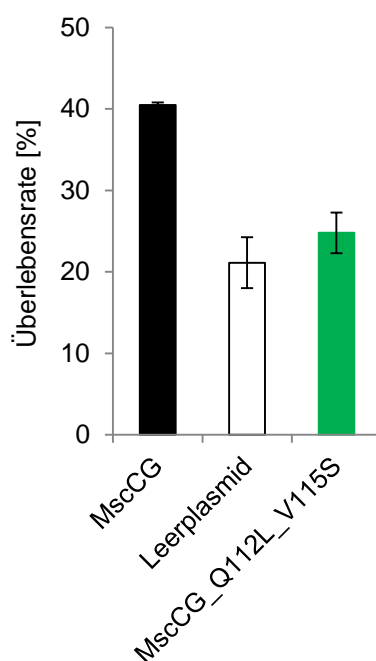


Abb. 15: Überlebensraten von *E. coli* MJF612 nach hypoosmotischem Schock. Zellen wurden zuvor in CG-Minimalmedium mit 0,5 M NaCl bis zur exponentiellen Phase kultiviert und nach Expression in Minimalmedium ohne NaCl überführt. Der hypoosmotische Schock erfolgte über 5 min. Nach mehrfacher Verdünnung wurden Zellen auf IPTG-haltigem Medium ausplattiert. Die Überlebensrate wurde aus der Relation von nichtgeschockten Zellen zu geschockten Zellen ermittelt (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=3$).

Insgesamt zeigen die Beobachtungen, dass MscCG tatsächlich den Glutamatefflux vermittelt und Glutamat durch die Pore von MscCG exkretiert wird. So wird der durch Penicillin ausgelöste Efflux nach Expression des LOF-Konstrukts zum Ausmaß der Deletionsmutante verringert (Abb. 12), jedoch mit einer GOF-Mutation derart verstärkt, dass dessen Expression bereits ohne Auslöser wie Penicillin in einer massiven Exkretion von Glutamat resultiert und sich in einem deutlich verminderten Wachstum widerspiegelt (Abb. 9). Auch eine Feinabstimmung der internen Betainakkumulation mittels BetP und MscCG wird durch eine LOF-Mutation beeinträchtigt. Ein Efflux von Betain kann nicht mehr beobachtet werden (Abb. 13), während eine eingeführte GOF-Mutation die Betainakkumulation durch

starken Efflux massiv beeinflusst (Abb. 10). Auch die Funktion von MscCG als Notventil bei hypoosmotischem Schock scheint deutlich beeinträchtigt zu sein. So wird die Fähigkeit einen hypoosmotischen Schock zu kompensieren, nach heterologer Expression von MscCG mit LOF-Mutationen in der Pore in *E. coli* MJF612 deutlich verringert (Abb. 15), was möglicherweise auf die erschwerte Aktivierung des Kanals zurückzuführen ist (Abb. 14).

3.2 Untersuchungen zur Rolle der C-terminalen Domäne von MscCG

Im Gegensatz zu MscS mit 286 Aminosäuren, setzt sich MscCG von *C. glutamicum* aus 533 Aminosäuren zusammen (Abb. 5). Beide Proteine besitzen eine große Sequenzähnlichkeit, insbesondere in den ersten drei Transmembrandomänen, von denen die dritte Transmembrandomäne die Pore der heptamerischen mechanosensitiven Kanäle bildet. Zusätzlich besitzt MscCG eine einzigartige C-terminale Verlängerung von 247 Aminosäuren, die ausschließlich in der Familie der *Corynebacteriaceae* zu finden ist und keine Ähnlichkeit mit anderen bekannten Proteinen besitzt. Die zusätzliche C-terminale Domäne beherbergt eine vierte Transmembrandomäne, wodurch der C-Terminus im Periplasma lokalisiert ist (Börngen, 2009). Die in *Corynebacteriaceae* stark konservierte Sequenz lässt aufgrund ihrer Einzigartigkeit eine spezifische Funktion vermuten. Diese Annahme wurde durch die Beobachtung verstärkt, dass die C-terminale Verkürzung um 110 Aminosäuren von NCgl1221 in *C. glutamicum* ATCC 13869 zu einem konstitutiven Efflux von Glutamat führt (Nakamura *et al.*, 2007). Eine Fusion der zusätzlichen Domäne mit MscS aus *E. coli* und die Expression dieses Chimärs in *C. glutamicum* führte außerdem im Vergleich zur heterologen Expression von MscS, zu einer verstärkten, durch Penicillin ausgelösten, Glutamatexkretion in *C. glutamicum* Δ mscCG. Zur funktionellen Aufklärung der Rolle der zusätzlichen Domäne wurden Verkürzungen und Modifikation konservierter Bereiche von MscCG, sowie des Fusionskonstrukts MscS/CtMscCG, vorgenommen.

3.2.1 Einfluss C-terminaler Verkürzungen von MscCG

Zur detaillierten Analyse der Rolle der C-terminalen Domäne erfolgte die Konstruktion und Plasmid-kodierte Expression verkürzter Varianten (Abb. 16) von MscCG-His mit dem Shuttle-Vektor pEKEEx2 im Deletionsstamm *C. glutamicum* $\Delta mscCG$.

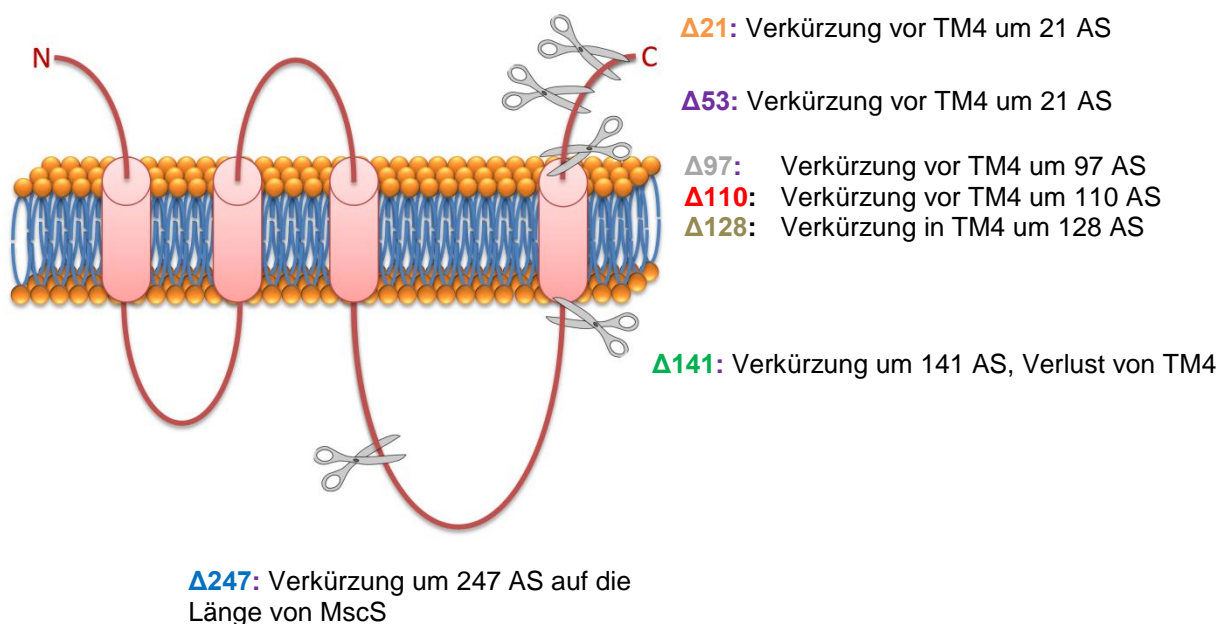


Abb. 16: Schematische Darstellung der Topologie von MscCG und Verkürzungsstellen zur Erstellung verkürzter Derivate. MscCG besitzt 4 Transmembrandomänen, von denen die vierte in der zu MscS zusätzlichen C-terminalen Domäne lokalisiert ist. Zur Analyse dieser Domäne wurden C-terminal verkürzte Varianten erstellt: $\Delta 247$: Trunkierung um 247 AS auf die Länge von MscS (286 AS); $\Delta 141$: Trunkierung um 141 AS und damit Verlust der vierten Transmembrandomäne (392 AS); $\Delta 128$: Trunkierung um 128 AS, innerhalb der 4. Transmembrandomäne, hinter einem stark konserviertem, hydrophoben Motiv (405 AS); $\Delta 110$: Trunkierung um 110 AS unmittelbar hinter der vierten Transmembrandomäne (Nakamura *et al.*, 2007) (423 AS); $\Delta 97$: Trunkierung um 97 AS, bei der ein stark konservierter Bereich im Gegensatz zur Verkürzung um 110 AS erhalten bleibt (436 AS); $\Delta 53$: Trunkierung des periplasmatischen Rests um 53 AS (480 AS) und $\Delta 21$: Trunkierung um 21 AS mit nur geringer Verkürzung des periplasmatischen C-Terminus von MscCG (512 AS).

Der Einfluss der vorgenommenen Verkürzungen auf den Glutamatefflux wurde unter Verwendung von 6 U/ml Penicillin G zum Auslösen der Glutamatexkretion untersucht. Die Expression der Konstrukte erfolgte mit 25 μ M IPTG. Alle Konstrukte mit Ausnahme der um 110 und 247 AS verkürzten Varianten, zeigten bei dieser Konzentration eine starke Expression (Abb. 17). Eine Erhöhung der IPTG-Konzentration für die Expression von

MscCG Δ 110-His und MscCG Δ 247-His hatten keine Erhöhung der Expression zur Folge (nicht abgebildet).

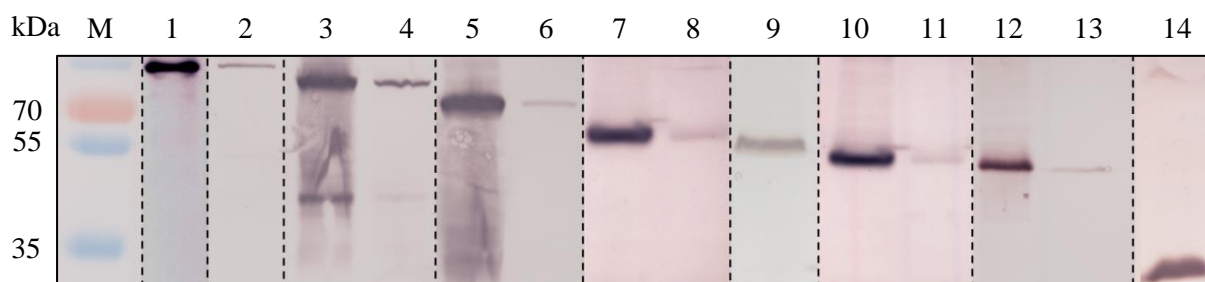


Abb. 17: Western Blot-Analyse von MscCG-His und verkürzten Derivaten. Die Expression von MscCG-His und verkürzten Derivaten erfolgte Plasmid-kodiert unter Verwendung von 25 μ M IPTG in *C. glutamicum* Δ mscCG. Zur Verringerung der Expression erfolgte keine Zugabe von IPTG. Es wurden jeweils 25 μ g Membranextrakt verwendet. Aufgrund der sehr schwachen Expression wurde für MscCG Δ 110-His (9) und MscCG Δ 247-His (14) jeweils 40 μ g Membranextrakt aufgetragen. Die immunologische Entwicklung erfolgte mittels Anti-Penta-His-Antikörper. Größenstandard (M); MscCG-His + IPTG (1), MscCG-His ohne IPTG (2); MscCG Δ 21-His + IPTG (3), MscCG Δ 21-His ohne IPTG (4); MscCG Δ 53-His mit IPTG (5), MscCG Δ 53-His ohne IPTG (6); MscCG Δ 97-His mit IPTG (7), MscCG Δ 97-His ohne IPTG (8); MscCG Δ 110-His (9), MscCG Δ 128-His mit IPTG (10), MscCG Δ 128-His ohne IPTG (11); MscCG Δ 141-His mit IPTG (12), MscCG Δ 141-His ohne IPTG (13) und MscCG Δ 247-His mit IPTG (14).

Die massive Überexpression von *mscCG-his* und einiger Verkürzungen hatte eine spontane Glutamatexkretion zur Folge, die ohne Zugabe von Penicillin G zu beobachten war. So zeigte insbesondere die starke Expression von Derivaten wie MscCG Δ 21-His, MscCG Δ 53-His und MscCG Δ 97-His mit Trunkierungen vor der vierten Transmembrandomäne eine spontane Exkretion ohne Penicillin. Im Gegensatz dazu hatte eine Verkürzung über die vierte Transmembrandomäne hinaus bei ebenfalls starker Überexpression, bzw. schwächerer Expression von MscCG Δ 247-His, keine spontane Exkretion zur Folge (Abb 18a).

Die Zugabe von Penicillin führte bei spontan exkretierenden Stämmen mit MscCG-His, MscCG Δ 21-His, MscCG Δ 53-His und MscCG Δ 97-His zu einem zusätzlichen bzw. verstärktem Efflux zu deren Basalexkretion (Abb. 18). Das Ausmaß der Penicillin-induzierten Exkretion von Glutamat verhält sich bei allen übrigen verkürzten Derivaten in einem wie für den WT ermitteltem Ausmaß. Dieses unterscheidet sich deutlich von der Exkretionsrate der Deletionsmutante *C. glutamicum* Δ mscCG (Abb. 18 und Tab. 8). Ein Sonderfall stellt die Verkürzung um 110 AS dar. Das Expressionslevel von MscCG Δ 110-His ist äußerst gering und hat gleichzeitig einen drastischen Einfluss auf das Wachstum, während die Expression aller übrigen verkürzten Derivate keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten hat (nicht abgebildet).

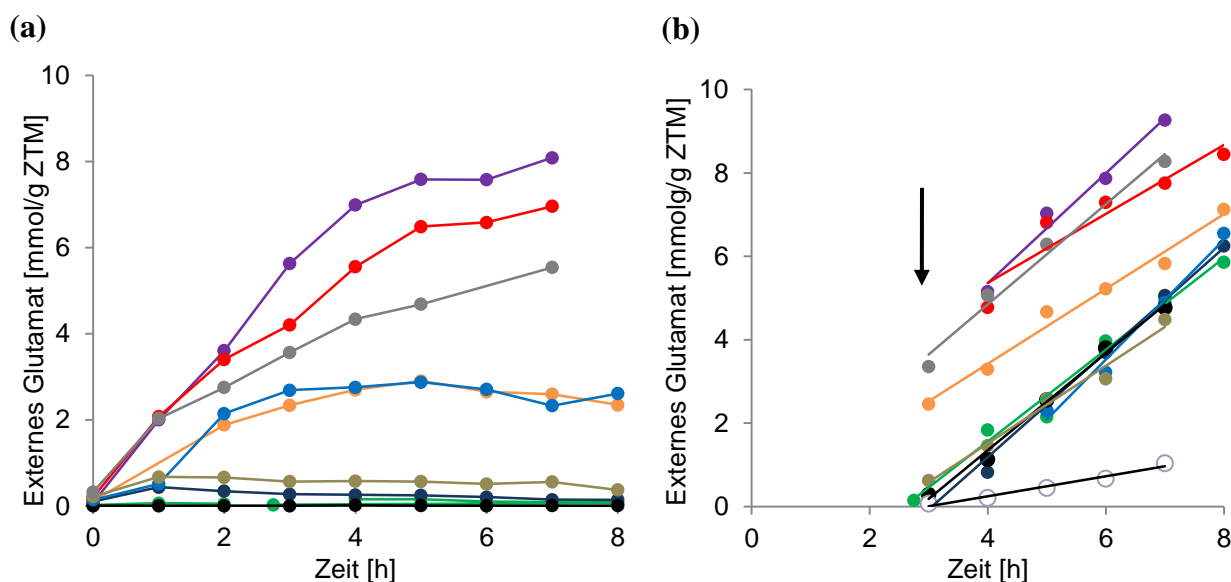


Abb. 18: Externe Glutamatkonzentration ohne Penicillin (a) und nach Auslösen der Exkretion mittels (b) Penicillin nach Induktion der Expression mit 25 μM IPTG. Dargestellt ist die Konzentration von Glutamat nach unterschiedlichen Zeitpunkten im externen Medium. Die Glutamatkonzentration wurde mittels HPLC analysiert. Die Zugabe von Penicillin G ist durch einen Pfeil markiert, wobei Geraden lineare Regressionen repräsentieren (b). Die Plasmid-kodierte Expression von MscCG-His und Derivaten erfolgte durch Induktion mittels 25 μM IPTG. ΔmscCG (o), WT (●), MscCG-His (●), MscCG Δ 21-His (●), MscCG Δ 53-His (●), MscCG Δ 97-His (●), MscCG Δ 110-His (●), MscCG Δ 128-His (●), MscCG Δ 141-His (●) und MscCG Δ 247-His (●).

Tab. 8: Glutamatexkretionsraten von MscCG und Derivaten bei Induktion der Expression mit 25 μM IPTG. Die Glutamatexkretionsraten wurden mittels linearer Regression der externen Glutamatkonzentrationen ermittelt. Die Expression der Konstrukte erfolgte unter Verwendung von 25 μM IPTG. $n \geq 3$

Stamm/ Konstrukt	Glutamatexkretionsrate [$\mu\text{mol g ZTM}^{-1} \text{min}^{-1}$]	
	ohne Penicillin	mit Penicillin
MscCG-His	11,3 \pm 0,4 (0-3 h)	17,6 \pm 2,8
MscCG Δ 21-His	13,1 \pm 0,53	14 \pm 1,3
MscCG Δ 53-His	15,4 \pm 4	19,6 \pm 2,4
MscCG Δ 97-His	10,7	17
MscCG Δ 110-His*	15,2 \pm 0,6	15 \pm 1,9
MscCG Δ 128-His	0	15,5
MscCG Δ 141-His	0	18,6 \pm 0,6
MscCG Δ 247-His*	0	19 \pm 1,9
WT	0	16,9 \pm 1,1
ΔmscCG	0	3,4 \pm 0,1

*schwache Expression

Um den Effekt der spontanen Exkretion von Glutamat aufgrund der massiven Expression auszuschließen, wurde diese durch Verzicht von IPTG reduziert und die Glutamatexkretion unter gleichen Bedingungen untersucht. Dies galt nicht für MscCG Δ 247-His, da die Expression bereits bei Induktion mit 25 μ M IPTG sehr schwach ausgeprägt war. Durch Auslassen der Induktion mittels IPTG verringerte sich die Expression von MscCG-His und verkürzten Derivaten deutlich (Abb. 19a).

Bei verringerter Expression von MscCG-His und verkürzten Derivaten, wurde keine spontane Exkretion von Glutamat beobachtet (Abb. 19b). Durch die Anpassung der Anzahl der Kanäle in der Cytoplasmamembran auf ein moderates Niveau, war kein konstitutiver Efflux messbar.

Eine spontan verursachte Exkretion von Glutamat wurde also nur bei starker Überexpression hervorgerufen, wenn die vierte Transmembrandomäne intakt war. Generell scheint die vermehrte Anwesenheit dieser Domäne also direkt einen Einfluss auf die Exkretion von Glutamat zu haben.

Ein Sonderfall bleibt MscCG Δ 110-His, das generell nur schwach exprimiert wird, aber immer eine spontane Exkretion hervorruft. So wurde ein Efflux mit einer Exkretionsrate von $14,6 \pm 0,7 \mu\text{mol g ZTM}^{-1} \text{min}^{-1}$ in den ersten drei Stunden ermittelt (Tab. 9).

Durch Zugabe von Penicillin wurde sowohl für MscCG-His, als auch für alle verkürzten Derivate eine annähernd gleiche Exkretionsrate gemessen, die der Rate des Wildtyps entspricht (Abb. 19 und Tab. 9). Da die Anzahl chromosomal-exprimierter Kanäle im WT äußerst gering ist und nicht per Western Blot-Analyse nachgewiesen werden kann, kann davon ausgegangen werden, dass bereits sehr geringe Mengen exprimierter Kanäle genügen, um eine dem WT entsprechende, durch Penicillin ausgelöste, Exkretionsrate zu erlangen. Die Reduzierung der Expression auf ein moderates Niveau führte zu ähnlichen Exkretionsraten durch Auslösung mittels Penicillin (Tab. 9).

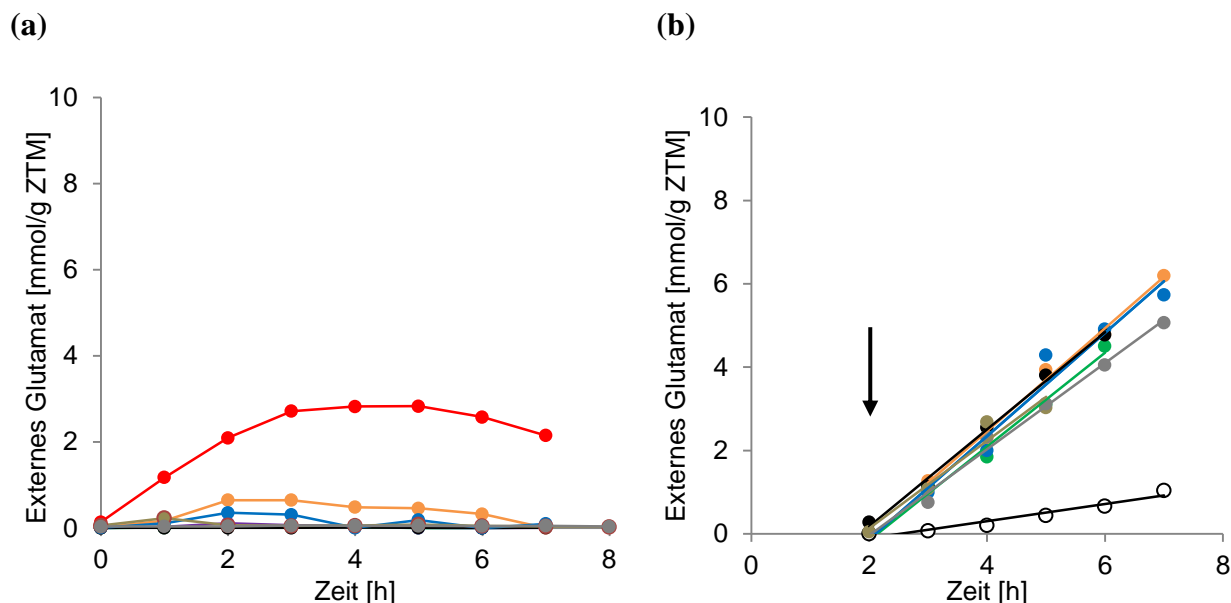


Abb. 19: Externe Glutamatkonzentration ohne Penicillin (a) und nach Auslösung der Exkretion mittels Penicillin (b) ohne Zugabe von IPTG. Dargestellt ist die Konzentration von Glutamat nach unterschiedlichen Zeitpunkten im externen Medium. Die Glutamatkonzentration wurde mittels HPLC analysiert. Die Zugabe von Penicillin ist durch einen Pfeil markiert, wobei Geraden lineare Regressionen repräsentieren (b). Es erfolgte keine Zugabe von IPTG. *ΔmscCG* (o), WT (●), *MscCG*-His (●), *MscCGΔ21*-His (●), *MscCGΔ53*-His (●), *MscCGΔ97*-His (●), *MscCGΔ110*-His (●), *MscCGΔ128*-His (●) und *MscCGΔ141*-His (●).

Tab. 9: Glutamatexkretionsraten von *MscCG* und Derivaten ohne Zugabe von IPTG. Die Glutamatexkretionsraten wurden mittels linearer Regression der externen Glutamatkonzentrationen ermittelt. Die Expression der Konstrukte erfolgte ohne Verwendung von IPTG. $n \geq 3$

Stamm/ Konstrukt	Glutamatexkretionsrate [$\mu\text{mol g ZTM}^{-1} \text{min}^{-1}$]	
	ohne Penicillin	mit Penicillin
<i>MscCG</i> -His	0	$18,7 \pm 0,9$
<i>MscCGΔ21</i> -His	0	19,2
<i>MscCGΔ53</i> -His	0	-
<i>MscCGΔ97</i> -His	0	16,9
<i>MscCGΔ110</i> -His	$14,6 \pm 0,7$	-
<i>MscCGΔ128</i> -His	0	17,5
<i>MscCGΔ141</i> -His	0	$17,5 \pm 0,9$
WT	0	$16,9 \pm 1,1$
<i>ΔmscCG</i>	0	$3,4 \pm 0,12$

Der Effekt einer C-terminalen Verkürzung von MscCG auf die Exkretion von Glutamat wird bei Betrachtung der Exkretion unter annähernd äquivalenter Expression deutlich (Abb. 20). Eine spontane Exkretion von Glutamat konnte dabei ausschließlich nach Expression des um 110 AS C-terminal, verkürzten Konstrukts beobachtet werden (Abb. 20a). Der Verlust der periplasmatischen Domäne führte gleichzeitig zu einer Verschlechterung des Wachstums (nicht abgebildet).

Die durch Penicillin ausgelöste Exkretion nach moderater Expression verkürzter Derivate war annähernd gleich und ähnelte dem des WT (Abb. 20b). Die schrittweise Verkürzung auf die Länge von MscS (MscCG Δ 247) und somit ein Fehlen der vierten Transmembrandomäne scheint unter diesen Bedingungen keinen Einfluss auf die ausgelöste Exkretion von Glutamat zu haben. Die Anwesenheit eines moderat exprimierten Kanals mit den ersten beiden Transmembrandomänen und der Poren-formenden, dritten Transmembrandomäne scheint also auszureichen, um eine Penicillin-ausgelöste Exkretion hervorzurufen. Die zusätzliche Domäne scheint nur bei massiver Expression einen Einfluss auf das Exkretionsverhalten zu haben, wobei die Verkürzung um 110 AS einen Sonderfall darstellt.

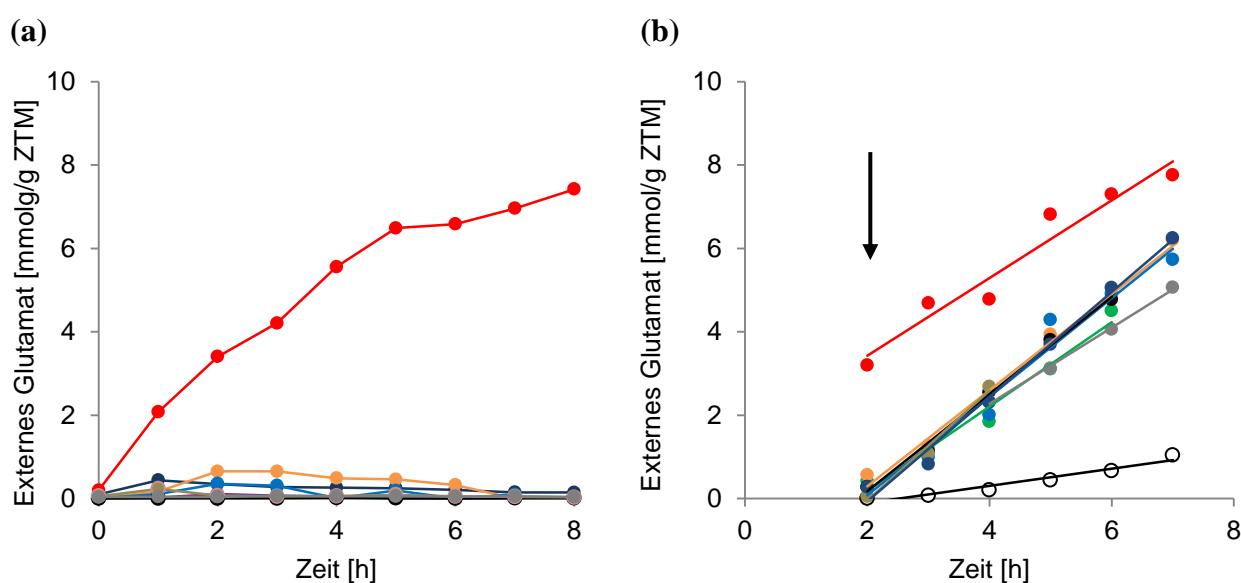


Abb. 20: Externe Glutamatkonzentration ohne Penicillin (a) und nach Auslösen der Exkretion mittels Penicillin (b) bei annähernd gleichen Expressionsniveaus von MscCG-His und verkürzten Derivaten. Dargestellt ist die Konzentration von Glutamat nach unterschiedlichen Zeitpunkten im Medium. Die Glutamatkonzentration wurde mittels HPLC ermittelt. Die Zugabe von Penicillin ist durch einen Pfeil markiert, wobei Geraden lineare Regressionen repräsentieren (b). Die Plasmid-kodierte Expression von MscCG-His und Derivaten wurde durch Anpassung der IPTG-Konzentration auf ein moderates Niveau reguliert. Δ *mscCG* (o), WT (●), MscCG-His (●), MscCG Δ 21-His (●), MscCG Δ 53-His (●), MscCG Δ 97-His (●), MscCG Δ 110-His (●), MscCG Δ 128-His (●), MscCG Δ 141-His (●) und MscCG Δ 247-His (●).

Mittels elektrophysiologischer Charakterisierung mit der *patch-clamp*-Technik wurde zuvor gezeigt, dass MscCG Eigenschaften eines mechanosensitiven Kanals besitzt (Börngen, 2009; Börngen *et al.*, 2010). Dazu wurde MscCG heterolog in *E. coli* MJF 465 ($\Delta mscK$, $\Delta mscL$ und $\Delta mscS$) exprimiert und Sphäroplasten zur *patch-clamp*-Analyse präpariert. Durch eine starke Versiegelung (*giga- Ω -seal*) einer Mikropipette mit der Cytoplasmamembran der *E. coli*-Sphäroplasten können Ströme, die durch Öffnung der Kanäle über die Membran fließen, gemessen werden. Vorherige Experimente zeigten, dass MscCG ein durch Membranspannung aktivierbarer Kanal ist, der eine ähnliche Leitfähigkeit wie MscM (~ 375 pS) von *E. coli* besitzt und im Gegensatz zu MscS keine Desensibilisierung bzw. Inaktivierung aufweist.

Im Folgenden wurden MscCG und verkürzte Derivate in *E. coli* MJF612 Sphäroplasten charakterisiert, in dem auch *mscM* deletiert ist. Die Expression von MscCG, MscCG Δ 110, MscCG Δ 141 und MscCG Δ 247 erfolgte vom Plasmid pQE60_ *lacI*, das eine Ampicillin-Resistenz vermittelt.

Die *patch-clamp*-Analyse der *inside-out-patches* von *E. coli* MJF612 Sphäroplasten zeigte sowohl für MscCG als auch die verkürzten Varianten eine Membranspannungs-abhängige Kanal-Aktivierung (Abb. 21). In Abhängigkeit der verwendeten IPTG-Konzentration wurden dabei mehrere Hundert Kanäle MscCG und MscCG Δ 141 beobachtet. Die Reduzierung der IPTG-Konzentration hatte eine nur geringfügige Verringerung der Anzahl der Kanäle in einem *patch* (ca. 1 μ m Durchmesser) zur Folge. Trotz der Verwendung hoher IPTG-Konzentrationen, war die Anzahl der Kanäle in *patches* von MscCG Δ 110 (Abb. 24) und MscCG Δ 247 (Abb. 26) und damit die Anzahl der Kanäle pro Zelle deutlich geringer, was auch die Expressionssituation in *C. glutamicum* widerspiegelt. Die elektrophysiologische Messung von MscCG Δ 110 war nur nach Zugabe von 50 μ M GdCl₃ möglich. So konnte ohne GdCl₃ keine dichte Versiegelung (*Giga- Ω -seal*) zwischen der Mikropipette und der Cytoplasmamembran hergestellt werden. In Anwesenheit von 50 μ M GdCl₃ war es schließlich möglich eine Versiegelung zu erreichen und Kanalaktivitäten aufzunehmen. Die Zugabe von GdCl₃ veränderte dabei die Leitfähigkeit von MscCG nicht, wie mit MscCG bei gleicher Konzentration überprüft wurde. Nach zehnminütiger Inkubation war die Leitfähigkeit von MscCG unverändert (Tab. 10), die Öffnung von Kanälen jedoch deutlich erschwert und bei längerer Inkubation nicht mehr möglich (nicht abgebildet). Die Messung des Stroms, bei unterschiedlich angelegter Spannung, ermöglichte die Berechnung der Leitfähigkeiten von MscCG und der verkürzten Varianten (Abb. 22). MscCG und auch die verkürzten Derivate zeigten eine deutliche Rektifizierung. In Abhängigkeit der

Ionenflussrichtung konnten unterschiedliche Leitfähigkeiten der Kanäle gemessen werden (Abb. 22). Weder die Verkürzung um 110 AS, das Fehlen der vierten Transmembrandomäne (MscCG Δ 141), noch eine Trunkierung auf die Länge von MscS (MscCG Δ 247) hatte einen Einfluss auf die Leitfähigkeit (Abb. 22, Tab. 10).

Die zusätzliche C-terminale Domäne scheint somit keinen direkten Einfluss auf die Leitfähigkeit der Pore von MscCG zu haben. Die Pore, die von der dritten Transmembrandomäne gebildet wird, scheint durch eine Verkürzung nicht direkt betroffen zu sein. Ein verändertes Glutamat-Effluxverhalten nach Verkürzung um 110 AS ist durch eine Änderung der Leitfähigkeit nicht zu begründen. Diese Trunkierung scheint jedoch einen anderen Einfluss auf die Kanal, bzw. Membraneigenschaften zu haben, da eine dichte Versiegelung zur Messung der Kanalaktivitäten nur in Anwesenheit von GdCl₃ möglich war. In wenigen Fällen wurde eine nur geringe Versiegelung der Membran und Pipette erreicht, bei der spontane Kanalaktivitäten und damit *gating*-Aktivität ohne Veränderung der Membranspannung mittels Unterdruck zu beobachten waren.

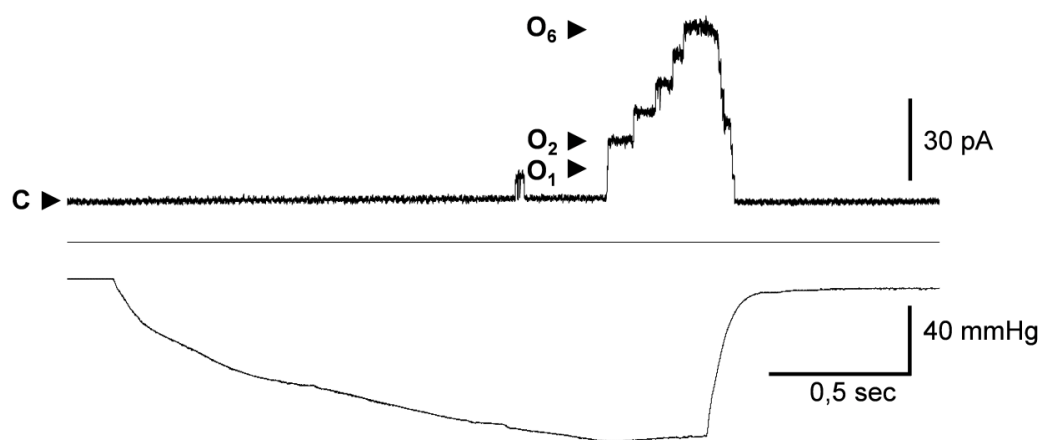


Abb. 21: Beispiel der Kanalaktivität von MscCG in *E. coli* MJF612-Sphäroplasten. Die Stromspur wurde unter asymmetrischen Bedingungen (Pipettenlösung: 200 mM KCl, 40 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,2; Badlösung: 250 mM KCl, 90 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,2), bei einer angelegten Spannung von +40 mV aufgenommen. Bei ansteigender Membranspannung durch Unterdruck ist die vermehrte Öffnung von Kanälen zu beobachten. C und O_n zeigen geschlossene (C) sowie die Anzahl geöffneter Kanäle an(O_n).

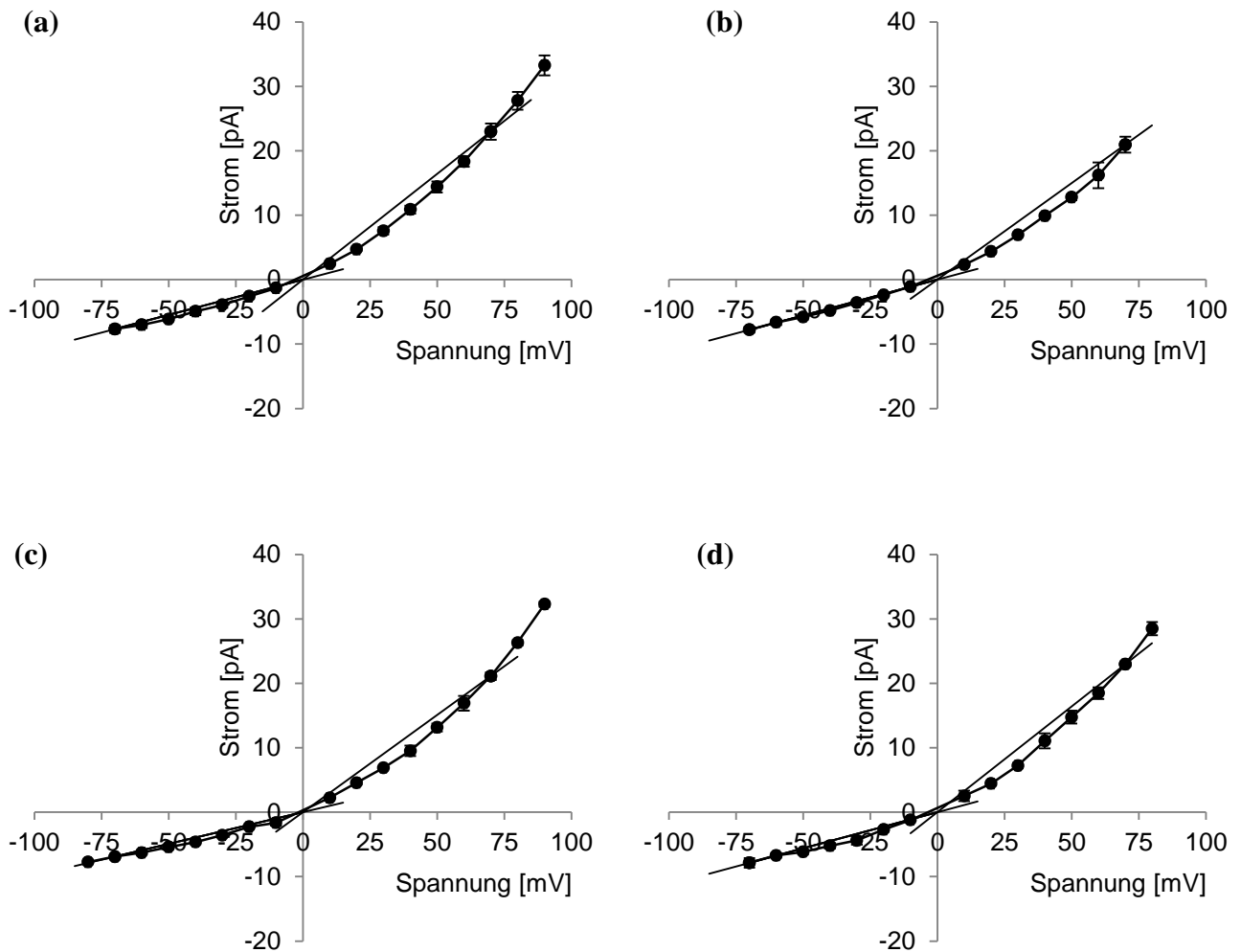


Abb. 22: Strom/Spannungs-Verhältnis von MscCG und verkürzten Derivaten in *E. coli* MJF612 Sphäroplasten. Die Messung erfolgte unter asymmetrischen Bedingungen (Pipettenlösung: 200 mM KCl, 40 mM MgCl₂, 5 mM HEPES; Badlösung: 250 mM KCl, 90 mM MgCl₂, 5 mM HEPES). Leitfähigkeiten wurden mittels linearer Regression von 0 bis +70 mV und 0 bis -70 mV. Die Steigung der Regressionsgerade repräsentiert die *chord conductance* von – bis +70 mV und -70 mV bis 0 mV. MscCG (a), MscCGΔ110 (b), MscCGΔ141 (c) und MscCGΔ247 (d).

Tab. 10: Leitfähigkeit von MscCG und trunkierten Derivaten. Die Leitfähigkeit wurde durch Auftragung der Strom-/Spannungsverhältnisses ermittelt und mittels linearer Regression zwischen 0 und +70 mV, sowie -70 und 0 mV berechnet.

Konstrukt	Leitfähigkeit je Spannungsrichtung [pS]	
	positiv	negativ
MscCG	328	110
MscCGΔ110	299	111
MscCGΔ141	302	99
MscCGΔ247	328	112
MscCG + GdCl₃	307	-
MscCGA106V	325	97

Chord conductance von 0 bis +70 mV und -70 bis 0 mV, die Messung der Leitfähigkeit in Anwesenheit von GdCl₃ erfolgte nach 10-minütiger Inkubation

Da sich die Leitfähigkeit durch eine C-terminale Verkürzung nicht verändert, wurde außerdem die Schwelle, des zur Öffnung des ersten Kanals benötigten Drucks im direkten Vergleich zu dem in *E. coli* MJF431 konstitutiv exprimierten mechanosensitiven Kanal MscL analysiert (Abb. 24 – Abb. 27). Die Verkürzung um 110 AS, sowie 141 AS und damit der Verlust der vierten Transmembrandomäne, hatten keine signifikante Veränderung des zur ersten Öffnung benötigten Drucks zur Folge (t-test mit $p < 0,05$). Eine Trunkierung auf die Länge von MscS (MscCGΔ247) äußerte sich jedoch in einen massiven Anstieg des Druckschwellenverhältnisses und der damit benötigten Membranspannung zum Öffnen der Kanäle (Abb. 27)

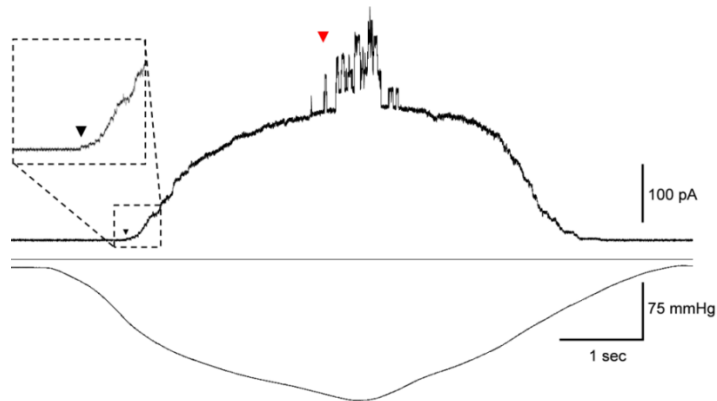


Abb. 23: Kanalaktivität von MscCG und MscL in *E. coli* MJF431-Sphäroplasten. *Patch-clamp* Aufnahmen der Kanalaktivitäten erfolgten bei einer Spannung von +30 mV an *E. coli* MJF431-Sphäroplasten nach Plasmid-kodierter Expression von MscCG, unter asymmetrischen Pufferbedingungen. Dargestellt ist die Stromspur und der angelegte Druck in der Pipette. MscCG-Aktivität kann bei deutlich geringerem Druck im Vergleich zu MscL beobachtet werden. Die Pfeile indizieren die erste Öffnung von MscCG (▼) und MscL (▼).

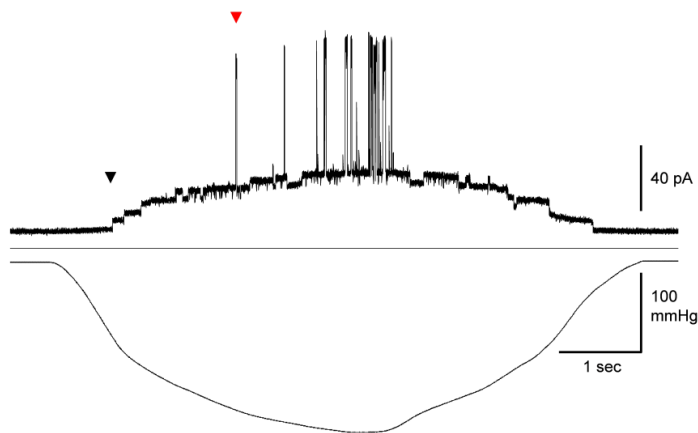


Abb. 24: Kanalaktivität von MscCGΔ110 und MscL in *E. coli* MJF431-Sphäroplasten. *Patch-clamp* Aufnahmen der Kanalaktivitäten erfolgten bei einer Spannung von +30 mV an *E. coli* MJF431 Sphäroplasten nach Plasmid-kodierter Expression von MscCGΔ110, unter asymmetrischen Pufferbedingungen. Dargestellt ist die Stromspur und der angelegte Druck in der Pipette. MscCGΔ110-Aktivität kann bei deutlich geringerem Druck im Vergleich zu MscL beobachtet werden. Die Pfeile indizieren die erste Öffnung von MscCGΔ110 (▼) und MscL (▼).

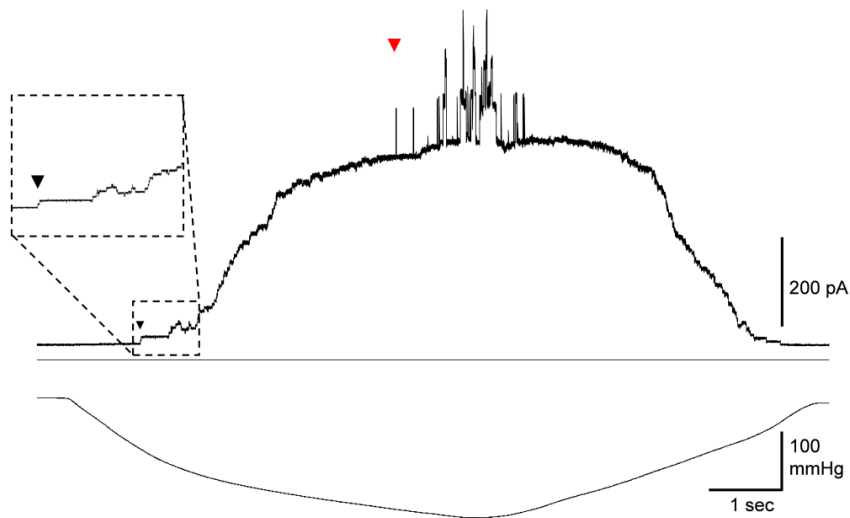


Abb. 25: Kanalaktivität von MscCG Δ 141 und MscL in *E. coli* MJF431-Sphäroplasten. *Patch-clamp* Aufnahmen der Kanalaktivitäten erfolgten bei einer Spannung von +30 mV an *E. coli* MJF431 Sphäroplasten nach Plasmid-kodierter Expression von MscCG Δ 141, unter asymmetrischen Pufferbedingungen. Dargestellt ist die Stromspur und der angelegte Druck in der Pipette. MscCG Δ 141-Aktivität kann bei deutlich geringerem Druck im Vergleich zu MscL beobachtet werden. Die Pfeile indizieren die erste Öffnung von MscCG Δ 141 (▼) und MscL (▼).

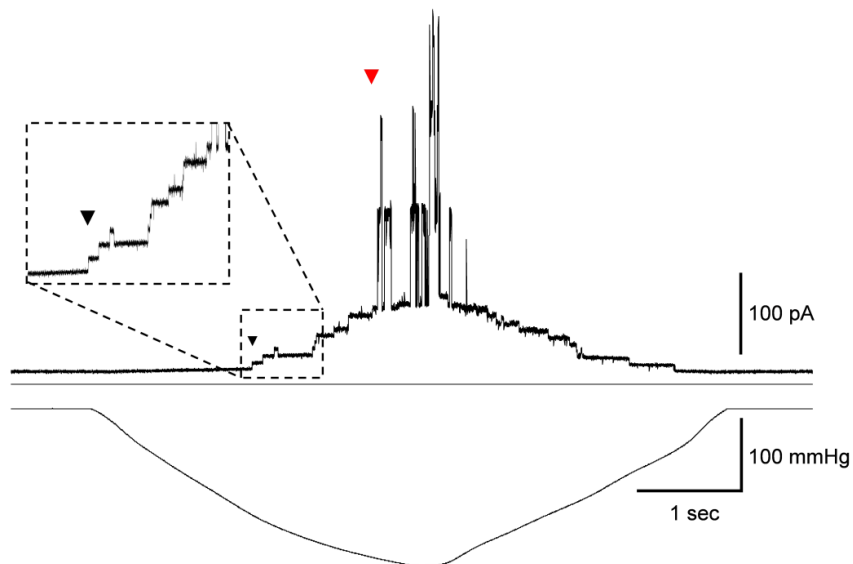


Abb. 26: Kanalaktivität von MscCG Δ 247 und MscL in *E. coli* MJF431-Sphäroplasten. *Patch-clamp* Aufnahmen der Kanalaktivitäten erfolgten bei einer Spannung von +30 mV an *E. coli* MJF431 Sphäroplasten nach Plasmid-kodierter Expression von MscCG Δ 247, unter asymmetrischen Pufferbedingungen. Dargestellt ist die Stromspur und der angelegte Druck in der Pipette. MscCG Δ 247-Aktivität kann bei deutlich geringerem Druck im Vergleich zu MscL beobachtet werden. Die Pfeile indizieren die erste Öffnung von MscCG Δ 247 (▼) und MscL (▼).

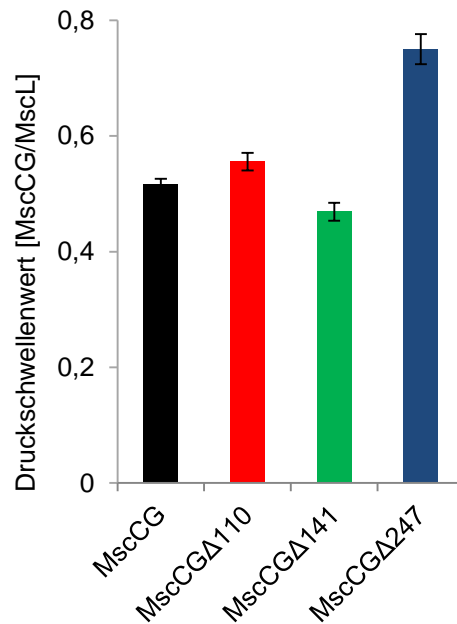


Abb. 27: Druckschwellenwerte von MscCG und verkürzten Derivaten in *E. coli* MJF431-Sphäroplasten im Verhältnis zu MscL. Die Druckschwellenwerte wurden im Verhältnis zum Druck bei der ersten Öffnung von MscL errechnet. MscCGΔ110 und MscCGΔ141 wiesen keinen signifikanten Unterschied zu MscCG auf (t-test mit $p < 0,05$). (Mittelwert \pm Standardfehler, $n \geq 5$).

Die Deletion von *mscCG* hat einen deutlichen Einfluss auf die Akkumulation von Betain unter hyperosmotischen Bedingungen. So konnte ein Einfluss von MscCG nach Plasmidkodierter (Über-)Expression auf den Efflux von Betain während der Betainakkumulation unter hyperosmotischen Bedingungen beobachtet werden. Unter *steady-state* Bedingungen wird die interne Konzentration von Betain mittels aktiver Aufnahme durch BetP und passivem Efflux durch MscCG abgestimmt (Börngen, 2009). Die Einführung einer GOF-Mutation führte zu einem vermehrten Efflux und damit einer drastischen Verringerung der Netto-Akkumulation von Betain unter hyperosmotischen Bedingungen. Die Expression eines LOF-Konstrukts verhinderte hingegen den Efflux während der Betainakkumulation (Abb. 13).

Die massive Expression von MscCG-His und verkürzter Varianten (MscCGΔ21-His, MscCGΔ53-His und MscCGΔ97-His), bei denen die vierte Transmembrandomäne noch vorhanden war, resultierte in einer spontanen Exkretion von Glutamat.

Unabhängig vom Expressionslevel, konnte jedoch keine zum Wildtyp veränderte Betainakkumulation und damit ein verstärkter Efflux von Betain bei diesen Konstrukten unter hyperosmotischen Bedingungen festgestellt werden (Abb. 28). Keine der bis zur vierten TM verkürzten Varianten zeigte trotz massiver Expression eine verminderte

Akkumulation von Betain unter hyperosmotischen Bedingungen nach hypoosmotischem Schock (Abb. 28). Die massive Überexpression von MscCG-His resultierte in einer leicht verringerten Fähigkeit Betain zu akkumulieren. Dieser Effekt wurde bei moderater Expression jedoch wieder aufgehoben.

Die Anwesenheit der vierten Transmembrandomäne scheint also einen unkontrollierten Efflux akkumulierten Betains zu verhindern. Dies wurde bei starker als auch moderater Expression beobachtet (Abb. 28). Die Zugabe eines mit 50 mM, massiven Überschusses unmarkierten Betains (*chase*) offenbarte einen Efflux, der sich jedoch nicht von dem des Wildtyps unterschied und die maximale, bis zum *steady-state* akkumulierte Betainkonzentration, nicht verringerte.

Die massive Expression von Konstrukten mit Trunkierungen, die über die vierte Transmembrandomäne hinausgehen (MscCG Δ 128-His, MscCG Δ 141-His und MscCG Δ 247-His), zeigten keine spontane Exkretion von Glutamat, wobei die durch Penicillin ausgelöste Exkretion weder durch die massive noch moderate Expression im Vergleich zum WT verändert wurde. Im Gegensatz dazu führte bereits eine schwache Expression von MscCG Δ 247-His und starken Expression von MscCG Δ 128-His, sowie MscCG Δ 141-His zu einer drastisch verringerten Fähigkeit, Betain unter hyperosmotischen Bedingungen zu akkumulieren (Abb. 29). Ein Sonderfall stellt erneut die um 110 AS verkürzte Variante dar. Die Anwesenheit von MscCG Δ 110-His führte bereits bei schwacher Expression zu einer spontanen Exkretion und resultiert in einem Verlust der Fähigkeit Betain zu akkumulieren. Der hydrophobe Bereich, der die vierte Transmembrandomäne bildet, ist bei dieser verkürzten Variante jedoch noch vorhanden und bildet den C-terminalen Bereich des Proteins.

Zusammenfassend scheint die zusätzliche Domäne und möglicherweise auch der konservierten cytoplasmatischen Bereiche vor dieser Domäne von wesentlicher, funktioneller Bedeutung zu sein. So wird bei Anwesenheit und starker Expression eine spontane Glutamatexkretion beobachtet, wohingegen das Fehlen dieses Bereichs keine spontane Exkretion zur Folge hat.

Eine bereits teilweise schwache Expression von Konstrukten mit fehlender vierter Transmembrandomäne genügt hingegen bereits die Fähigkeit, Betain nach einem hypoosmotischem Schock zu akkumulieren, zu verlieren.

Tab. 11: Membranpotential von *C. glutamicum* $\Delta mscCG$ nach Expression von MscCG-His und verkürzten Derivaten. Das Membranpotential wurde unter Verwendung von TPP ermittelt. Das Membranpotential ohne Schock wurde nach Wachstum unter hyperosmotischen Bedingungen in BHI mit 0,5 M NaCl (ca. 1,3 osmol/ kg) bestimmt. Außerdem wurden die Potentiale nach einem hypoosmotischen Schock (ca. 0,1 osmol/kg), unter hyperosmotischen Bedingungen (ca. 1,8 osmol/kg) während der Betainakkumulation ermittelt. Die Induktion der Expression erfolgte unter Verwendung von 25 μ M IPTG.

Stamm/ Konstrukt	Membranpotential [mV]	
	BHI + 0,5 M NaCl	nach hypoosm. Schock
MscCG-His	210	216
MscCG Δ 21-His	198	209
MscCG Δ 53-His	218	207
MscCG Δ 97-His	204	186
MscCG Δ 110-His	157	168
MscCG Δ 128-His	205	162
MscCG Δ 141-His	199	143
MscCG Δ 247-His	213	159
WT	204	205
$\Delta mscCG$	201	217

Da die massive Expression jedoch nicht die Situation der konstitutiv geringen Expression im Wildtyp widerspiegelt, scheint der Effekt der spontanen Glutamatexkretion durch eine ausgelöste Überexpression hervorgerufen zu sein. Die Trunkierung des C-terminalen, periplasmatischen Bereichs nach der vierten Transmembrandomäne scheint weder einen Einfluss auf die Exkretion von Glutamat, noch auf den Efflux von Betain und damit der Akkumulation von Betain unter hyperosmotischen Bedingungen zu haben. Für den Efflux scheint insgesamt eine Länge von 247 AS, was der Länge von MscS mit den ersten drei Transmembrandomänen entspricht, auszureichen, um eine Änderung der Membranspannung wahrzunehmen und kompatible Solute sowie Ionen passieren zu lassen. Die zusätzliche Domäne inklusive der vierten Transmembrandomäne scheint dabei eine regulatorische Funktion einzunehmen.

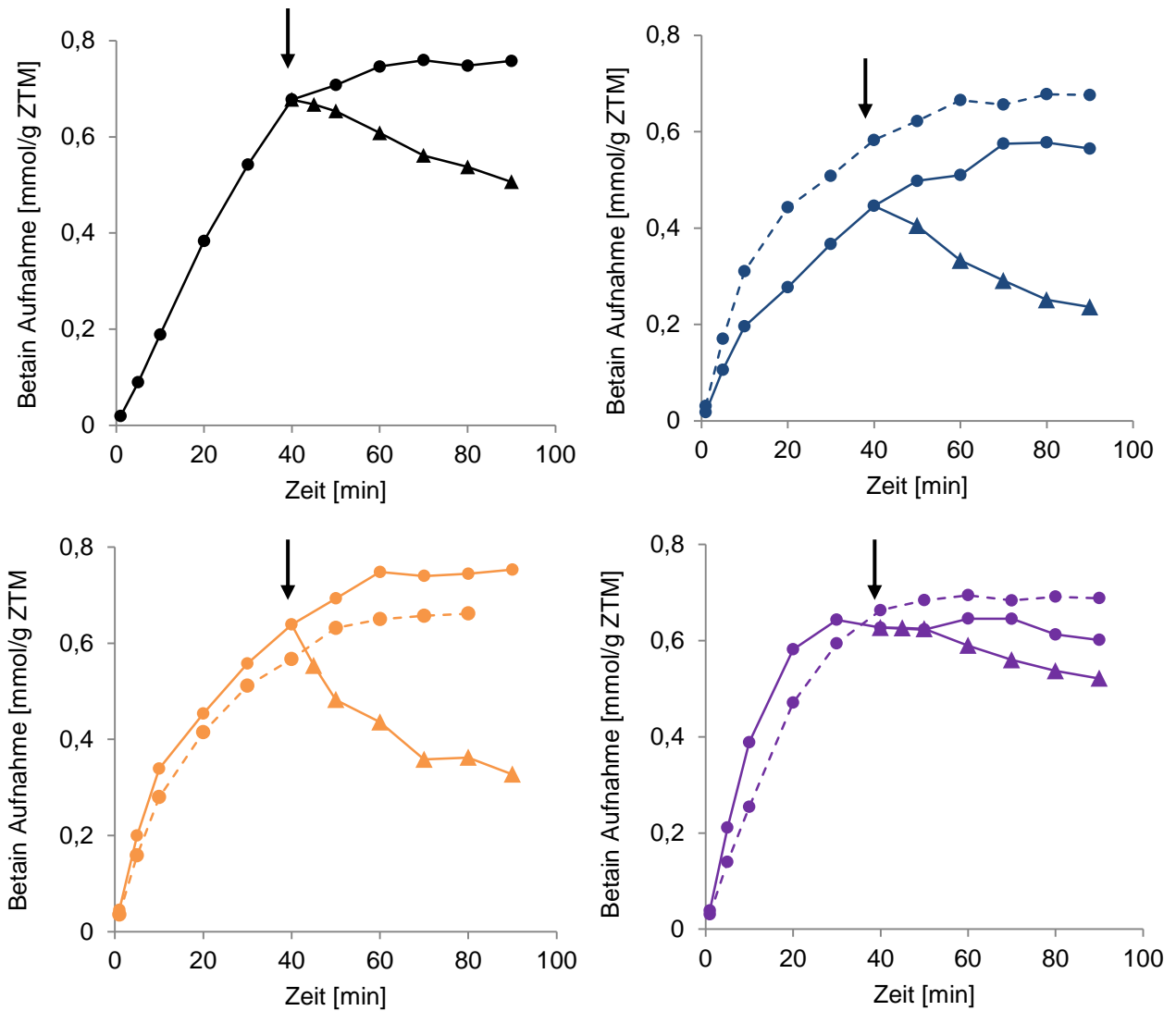


Abb. 28: Betainakkumulation und Efflux unter hyperosmotischen Bedingungen. Die Betainakkumulation erfolgte unter hyperosmotischen Bedingungen bis zum *steady-state*. Die Menge radioaktiv markierten Betains im Cytoplasma wurde mit schneller Filtration ermittelt. Die Zugabe eines Überschusses (50 mM) unmarkierten Betains (*chase*) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die moderate, Plasmid-kodierte Expression in *C. glutamicum* $\Delta mscCG$ erfolgte ohne Zugabe von IPTG (gestrichelte Linien), die starke Expression erfolgte durch Induktion mit 25 μ M IPTG. WT (●) nach *chase* (▲), MscCG-His (●) nach *chase* (▲), MscCG Δ 21-His (●) nach *chase* (▲) und MscCG Δ 53-His (●) nach *chase* (▲).

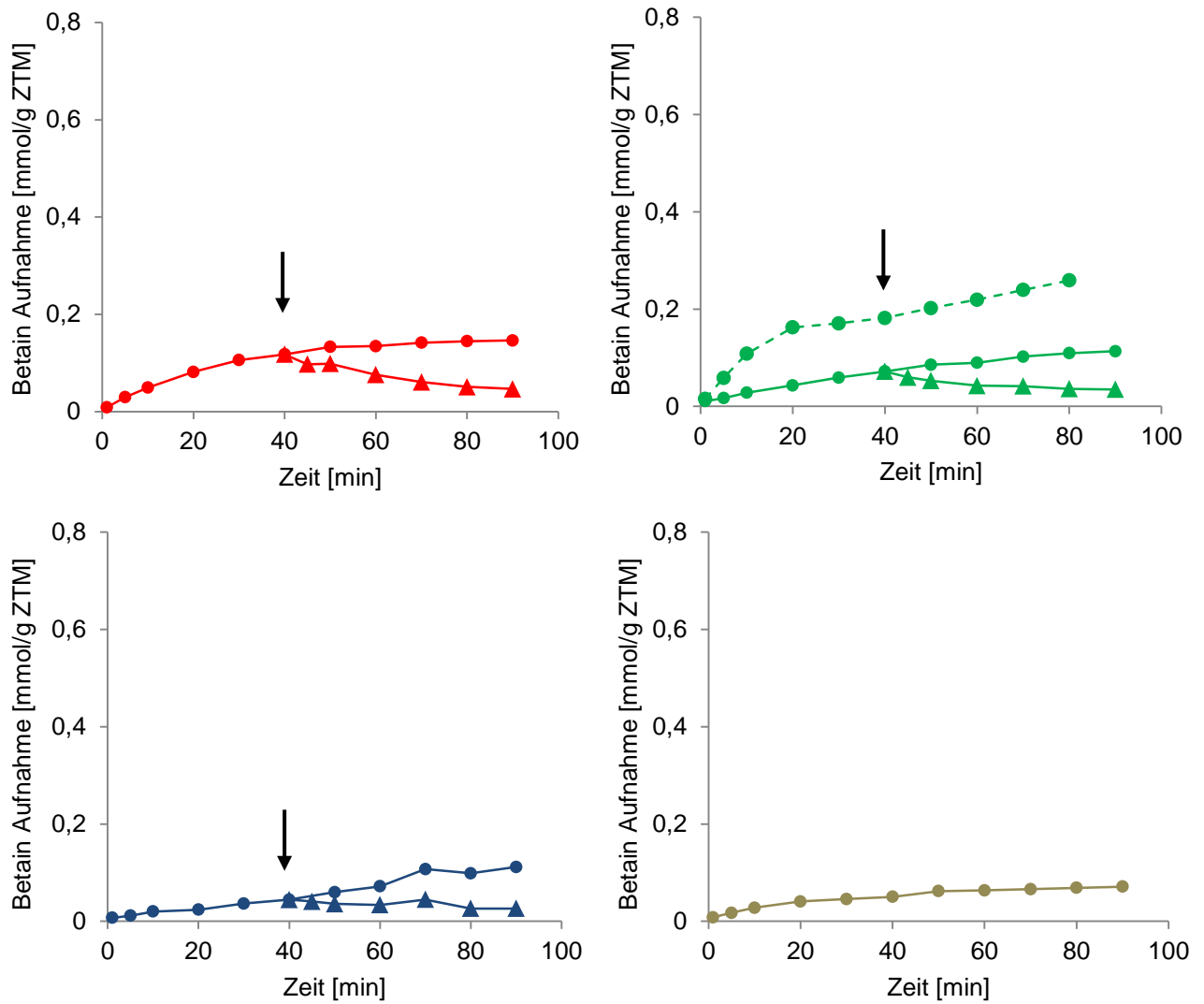


Abb. 29: Betainakkumulation und Efflux unter hyperosmotischen Bedingungen. Die Betainakkumulation erfolgte unter hyperosmotischen Bedingungen. Die Menge radioaktiv markierten Betains im Cytoplasma wurde mit schneller Filtration ermittelt. Die Zugabe eines Überschusses (50 mM) unmarkierten Betains (*chase*) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die moderate, Plasmid-kodierte Expression in *C. glutamicum* $\Delta mscCG$ erfolgte ohne Zugabe von IPTG (gestrichelte Linien), die starke Expression erfolgte durch Induktion mit 25 μ M IPTG, wobei *MscCG* Δ 110-His und *MscCG* Δ 247-His mit 25 μ M nur eine schwache Expression zeigten. *MscCG* Δ 110-His (●) nach *chase* (▲), *MscCG* Δ 141-His (●) nach *chase* (▲), *MscCG* Δ 247-His (●) nach *chase* (▲) und *MscCG* Δ 128-His (●).

3.2.2 Untersuchungen zur Rolle der C-terminalen Domäne mit MscS-Fusionskonstrukten

Im Gegensatz zum Verlust, zeigte auch die massive Expression und damit vermehrte Anwesenheit der zusätzlichen Domäne einen positiven Effekt auf die Exkretion von Glutamat. Hingegen wurde kein vermehrter Efflux von Betain und damit einhergehende, reduzierte Netto-Betainakkumulation festgestellt, was insgesamt auf eine regulatorische Funktion hindeutet.

Der *E. coli*-Kanal MscS mit 286 AS und großer Ähnlichkeit zu MscCG, besitzt diese Domäne nicht. MscCG benötigt für eine Membranspannungs-abhängige Aktivierung und einen Penicillin-ausgelösten Efflux ebenfalls nur eine Länge von 286 AS (Abb. 19). Auch die heterologe Expression von MscS in *C. glutamicum* $\Delta mscCG$ führte zu einer deutlichen Erhöhung der Exkretionsrate von Glutamat unter Verwendung von Penicillin als Auslöser.

Um die Funktion der zusätzlichen Domäne aufzuklären wurde deshalb MscS als Grundlage des Kanals verwendet und die zusätzliche C-terminale Domäne fusioniert. Die Expression eines Fusionskonstrukts (MscS/CtMscCG, Abb. 30) resultierte in einer weiteren Erhöhung der Exkretion von Glutamat (Börngen, 2009). Durch Manipulation des MscS-Teils durch Einfügen bekannter LOF- und GOF-Mutationen konnte gezeigt werden, dass der ausgelöste Efflux von Glutamat auch durch den Kanalteil von MscS vermittelt wird.

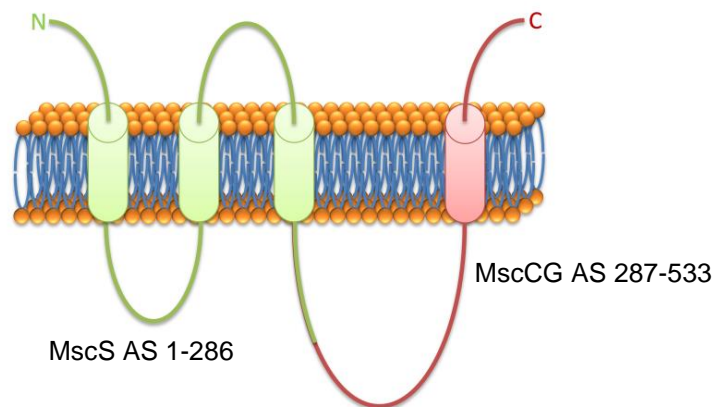


Abb. 30: Schematische Darstellung der Topologie von MscS/CtMscCG mit MscS (286 AS), fusioniert mit der zusätzlichen C-terminalen Domäne von MscCG (AS 287-533). MscS besitzt drei Transmembrandomänen, von denen die zweite und dritte, Poren-formende Domäne eine große Homologie zu MscCG aufweist. Zur Analyse der zusätzlichen Domäne von MscCG mit einer vierten Transmembrandomäne, wurden diese mit MscS (grün) C-Terminal fusioniert (rot).

Die heterologe Expression von MscS-His führte mit $9,47 \pm 0,01 \mu\text{mol g ZTM}^{-1} \text{min}^{-1}$ zu einem deutlichen Anstieg der Exkretionsrate im Vergleich zur Deletionsmutante ($3,4 \pm 0,1 \mu\text{mol g ZTM}^{-1} \text{min}^{-1}$). Die Expression des Fusionskonstrukts MscS/CtMscCG-His resultierte in einer weiteren Steigerung der Exkretion auf eine Rate von $14 \pm 0,8 \mu\text{mol g ZTM}^{-1} \text{min}^{-1}$.

(Abb. 31 und Tab. 12). Diese Beobachtung erhärtet die Vermutung, dass die zusätzliche Domäne von MscCG möglicherweise eine regulatorische Funktion auf die Kanaldomäne bei der Exkretion von Glutamat einnimmt.

Zur Definierung des Bereichs der zusätzlichen Domäne, der eine möglicherweise regulatorische Rolle spielt, wurde ein um 110 AS C-terminal verkürztes Fusionskonstrukt exprimiert. Die Verkürzung von MscCG um 110 AS führt zu einer spontanen Exkretion von Glutamat bei gleichzeitig drastischer Verringerung des Wachstums und des Membranpotentials nach hypoosmotischem Schock. Die C-terminale Verkürzung um 110 AS von MscS/CtMscCG-His hatte keinen Einfluss auf das Exkretionsverhalten. Eine spontane Exkretion konnte hier nicht beobachtet werden (Abb. 31 und Tab. 12). Dagegen war der durch Penicillin ausgelöste Efflux von MscS/CtMscCG Δ 110-His mit $15,4 \pm 0,7 \mu\text{mol g ZTM}^{-1} \text{min}^{-1}$ zu MscS/CtMscCG-His kaum verändert. Die im Vergleich zu MscS erhöhte Exkretion ist also nicht auf den periplasmatischen Anteil der zusätzlichen Domäne zurückzuführen. Außerdem scheint eine Trunkierung um 110 AS nur in Verbindung mit der Kanalregion von MscCG einen drastischen Effekt hervorzurufen.

Die Beobachtung, dass der Effekt der spontanen Exkretion nur in Verbindung mit der Kanalregion von MscCG beobachtet werden kann, lässt auf eine möglicherweise spezifische Interaktion mit der vierten Transmembrandomäne und/oder dem Bereich davor schließen. Ein MscS-Fusionskonstrukt mit Deletion der vierten Transmembrandomäne aus MscCG konnte nicht exprimiert werden (nicht abgebildet).

Eine Fusion der bei MscCG periplasmatisch lokalisierten C-terminalen Domäne an MscS (MscS/CTMscCG406-423-His) hatte keinen Einfluss auf die Glutamatexkretionsrate (Abb. 31 und Tab. 12). Aufgrund der Erhöhung der Glutamatexkretion nach Fusion der C-terminalen Domäne scheint diese auch eine Funktion bei der Exkretion von Glutamat mittels MscS einzunehmen. So genügt bereits eine von MscS gebildete Pore, um mit Penicillin eine Exkretion auszulösen. Die Anwesenheit der zusätzlichen Domäne verstärkt den Effekt deutlich. Die Beobachtung, dass eine spontane Exkretion hingegen bei der um 110 AS verkürzten Fusionsvariante keinen Einfluss hat, weist auf einen mit der Kanalregion von MscCG spezifischen Mechanismus hin. Dennoch reicht die Fusion der AS 287-423 von MscCG und damit auch Anwesenheit der vierten Transmembrandomäne aus, um einen verstärkten Efflux hervorzurufen.

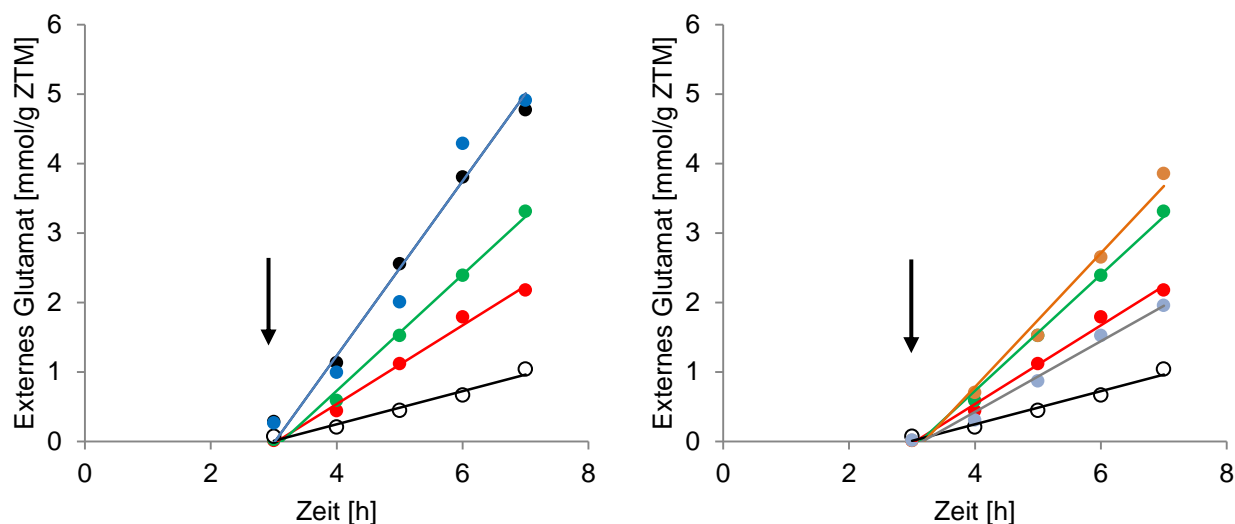


Abb. 31: Externe Glutamatkonzentration nach Auslösen der Exkretion mittels Penicillin. Dargestellt ist die Konzentration von Glutamat nach unterschiedlichen Zeitpunkten im Medium. Die Glutamatkonzentration wurde mittels HPLC analysiert. Die Zugabe von Penicillin ist durch einen Pfeil markiert. Geraden repräsentieren lineare Regressionen. Die Induktion der Expression erfolgte mit je 25 μM IPTG. ΔmscCG (o), WT (●), MscCG-His (●), MscS-His (●), MscS/CtMscCG-His (●), MscS/CtMscCG Δ 110-His (●) und MscS/CtMscCG406-423-His (●).

Tab. 12: Glutamatexkretionsraten von MscCG-His, MscS-His und Derivaten bei moderater Expression Die Glutamatexkretionsraten wurden mittels linearer Regression der externen Glutamatkonzentrationen ermittelt. Die Induktion einer moderaten Expression der Konstrukte erfolgte unter Verwendung von 25 μM IPTG. $n \geq 3$

Stamm/ Konstrukt	Glutamatexkretionsrate [$\mu\text{mol g ZTM}^{-1} \text{min}^{-1}$]	
	ohne Penicillin	mit Penicillin
MscCG-His*	0	$18,7 \pm 0,9$
MscS-His	0	$9,5 \pm 0,01$
MscS/CtMscCG-His	0	$13,8 \pm 0,2$
MscS/CtMscCG Δ 110-His	0	$15,4 \pm 0,7$
MscS/CtMscCG424-533-His	0	$9,0 \pm 0,8$
WT	0	$16,9 \pm 1,1$
ΔmscCG	0	$3,4 \pm 0,12$

* ohne IPTG

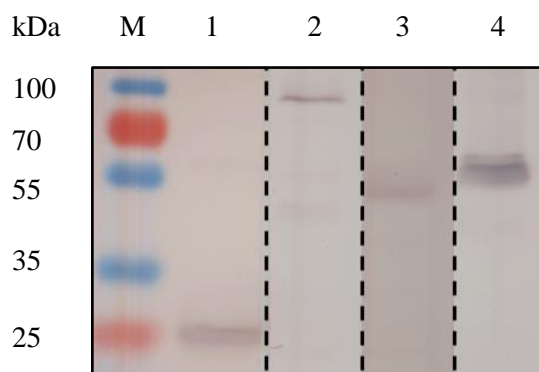


Abb. 32: Western Blot-Analyse von MscS-His und Fusionskonstrukt MscS/CtMscCG-His. Die Expression von MscCG-His und verkürzten Derivaten erfolgte Plasmid-kodiert unter Verwendung von 25 μ M IPTG in *C. glutamicum* Δ mscCG.. Für die SDS-PAGE wurden jeweils 25 μ g Membranextrakt verwendet. Die immunologische Detektion erfolgte mittels Anti-Penta-His-Antikörper. Größenstandard (M); MscS-His (1), MscS/CtMscCG-His (2), MscS/CtMscCG Δ 110-His und MscS/CtMscCG424-533-His (4).

Der Einfluss der zusätzlichen Domäne wird unter Betrachtung der Betainakkumulation ebenfalls deutlich. Diese war nach Expression des Fusionskonstrukts im Vergleich zu MscS-His verringert. So wurde ein *steady-state* nach 90 min nicht erreicht, während Zellen nach Expression von MscS-His bereits nach 40 Minuten eine Sättigung zeigten. Auch die heterologe Expression von MscS-His führt demnach zu einem Efflux unter hyperosmotischen Bedingungen, wobei sich die Netto-Akkumulation im Vergleich zu Wildtyp oder nach Komplementation nicht unterschied (Abb. 33) und das Membranpotential nicht beeinträchtigt war (Tab. 13).

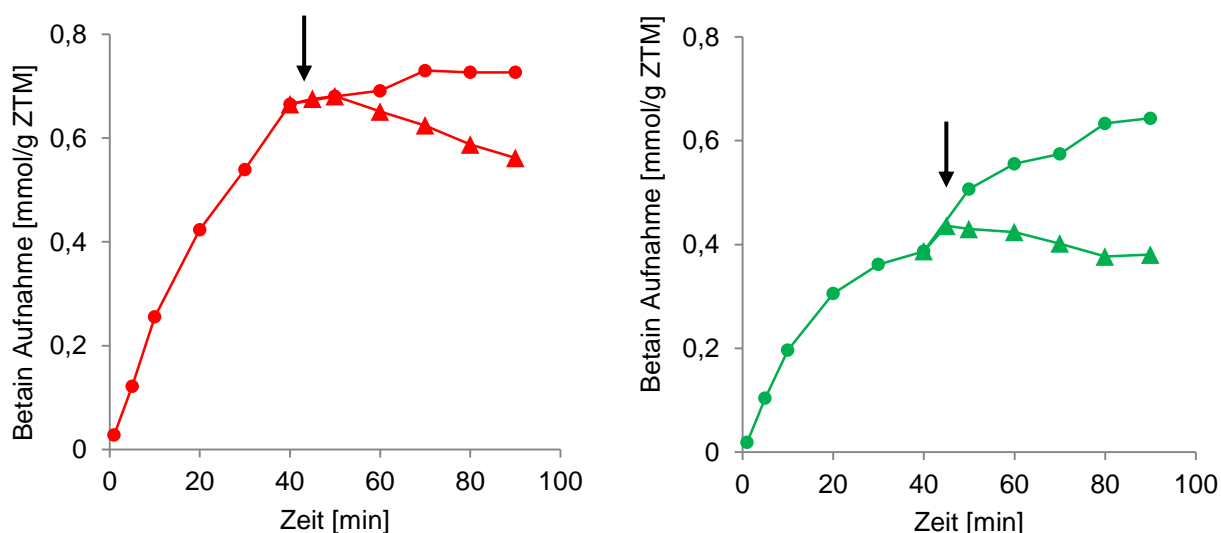


Abb. 33: Betainakkumulation und Efflux unter hyperosmotischen Bedingungen. Die Menge radioaktiv markierten Betains im Cytoplasma wurde mit schneller Filtration ermittelt. Die Zugabe eines Überschusses (50 mM) unmarkierten Betains (*chase*) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die moderate, Plasmid-kodierte Expression in *C. glutamicum* Δ mscCG erfolgte ohne Zugabe von 25 μ M IPTG. MscS-His (●) nach *chase* (▲) und MscS/CtMscCG-His (●) nach *chase* (▲).

Tab. 13: Membranpotential von *C. glutamicum* Δ mscCG nach Expression von MscCG-His, MscS-His und dem Fusionskonstrukt MscS/CtMscCG-His. Das Membranpotential wurde unter Verwendung von TPP ermittelt. Das Membranpotential ohne Schock wurde nach Wachstum unter hyperosmotischen Bedingungen in BHI mit 0,5 M NaCl (ca. 1,3 osmol/ kg) bestimmt. Außerdem wurden die Potentiale nach einem hypoosmotischem Schock (ca. 0,1 osmol/kg), unter hyperosmotischen Bedingungen (ca. 1,8 osmol/kg) während der Betainakkumulation berechnet. Die Induktion der Expression erfolgte unter Verwendung von 25 μ M IPTG.

Stamm/ Konstrukt	Membranpotential [mV]	
	BHI + 0,5 M NaCl	nach hypoosm. Schock
MscCG-His	210	216
MscS-His	201	203
MscS/CtMscCG-His	214	192

Die elektrophysiologische Charakterisierung von MscCG zeigte, dass C-terminale Trunkierungen und auch das Entfernen der kompletten zusätzlichen C-terminalen Domäne (MscCG Δ 247) keinen Einfluss die Leitfähigkeit hatte, obgleich eine Veränderung des Druckschwellenwerts zur Aktivierung der mechanosensitiven Kanäle beobachtet wurde (Abb. 27). Ein Einfluss der Fusion auf mechanosensitive Eigenschaften wurde ebenfalls elektrophysiologisch überprüft (Abb. 34).

Die *patch-clamp*-Analyse von MscS und MscS/CtMscCG erfolgte nach Plasmid-kodierter Expression in *E. coli* MJF465 (Δ mscK, Δ mscS und Δ mscL) Sphäroplasten.

In *inside-out-patches* zeigte MscS/CtMscCG wie MscS eine Membranspannung-abhängige Aktivierung, sowie eine MscS-typische Desensibilisierung (Abb. 34). Im Gegensatz zu MscS war die Rektifizierung des Fusionskonstrukts nicht zu ermitteln, da bei einer angelegten negativen Spannung keine eindeutigen Einzelkanalöffnungen zu identifizieren waren. Bereits eine schwache elektrische Spannung von -10 mV bzw. -20 mV führte zu flackernden Kanalaktivitäten bei geringer Membranspannung (Abb. 35). Die Leitfähigkeit bei positiver Spannung wurde durch die zusätzliche C-terminalen Domäne nicht beeinflusst. So lag die gemessene Leitfähigkeit von MscS in *E. coli* MJF465 Sphäroplasten bei ca. 1,25 nS und unterschied sich von der Leitfähigkeit des Fusionskonstrukts mit ca. 1,25 nS nicht (Abb. 36, Tab. 14). Außerdem bleibt festzuhalten, dass die Leitfähigkeit von MscCG mit ca. 0,33 nS deutlich geringer war und durch Einfügen von LOF-Mutationen in das Fusionskonstrukt, keine Kanalaktivität beobachtet werden konnte (nicht abgebildet).

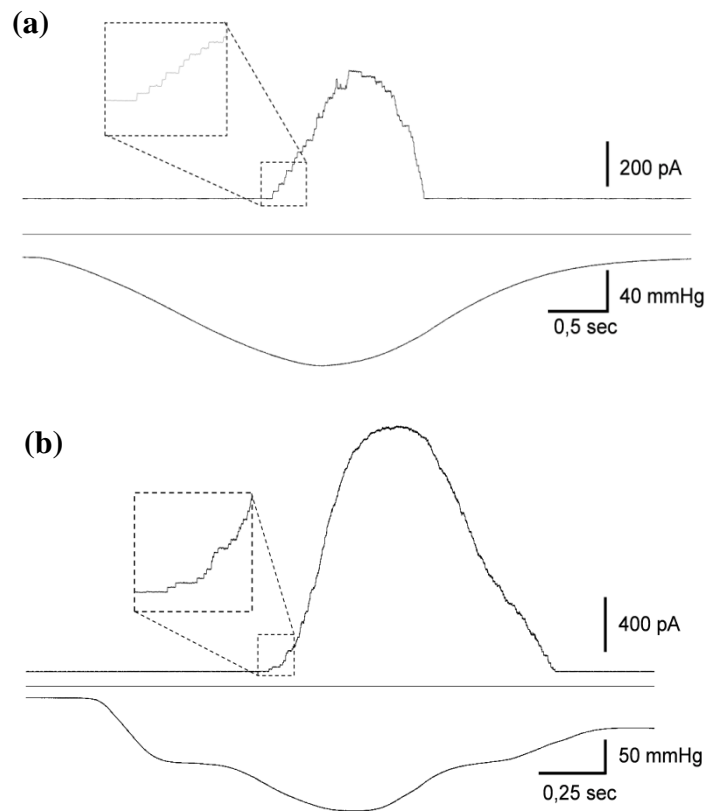


Abb. 34: Beispiel der Kanalaktivität von MscS (a) und MscS/CtMscCG (b) in *E. coli* MJF465-Sphäroplasten. Die Aufnahme der Stromspur erfolgte unter asymmetrischen Bedingungen (Pipettenlösung: 200 mM KCl, 40 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,2; Badlösung: 250 mM KCl, 90 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,2), bei einer angelegten Spannung von +30 mV. Bei ansteigender Membranspannung durch Unterdruck ist die vermehrte Öffnung von Kanälen zu beobachten.

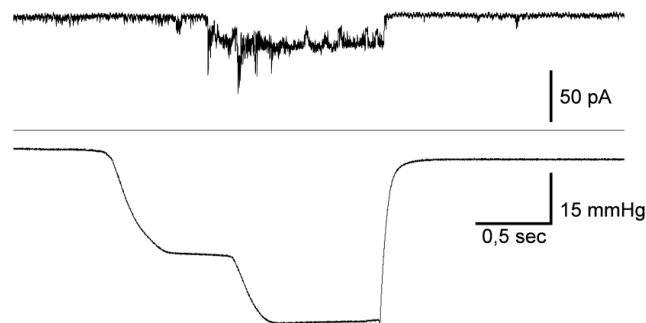


Abb. 35: Beispiel der Kanalaktivität von MscS/CtMscCG in *E. coli* MJF465 Sphäroplasten bei negativer Spannung. Die Aufnahme der Stromspur erfolgte unter asymmetrischen Bedingungen (Pipettenlösung: 200 mM KCl, 40 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,2; Badlösung: 250 mM KCl, 90 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,2), bei einer angelegten Spannung von -20 mV. Bei ansteigender Membranspannung durch Unterdruck waren Einzelkanalöffnungen nicht mehr zu erkennen und die Kanalaktivitäten zeichneten sich durch starkes Flackern aus.

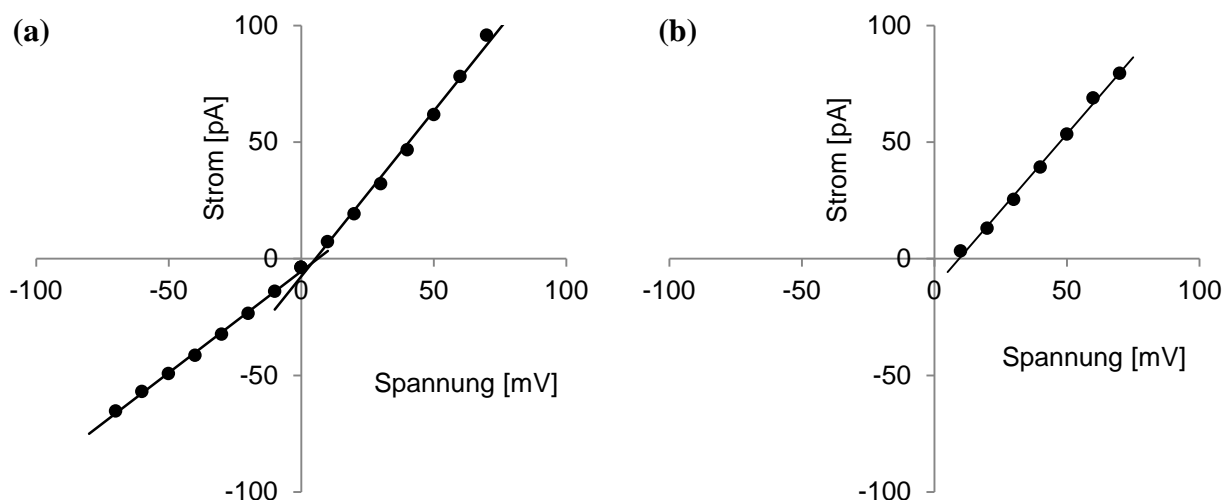


Abb. 36: Strom/Spannungs-Verhältnis von MscS und MscCG/CtMscCG in *E. coli* MJF465 Sphäroplasten. Die Messung erfolgte unter asymmetrischen Bedingungen (Pipettenlösung: 200 mM KCl, 40 mM MgCl₂, 5 mM HEPES; Badlösung: 250 mM KCl, 90 mM MgCl₂, 5 mM HEPES). Leitfähigkeiten wurden mittels linearer Regression ermittelt. MscS (a) und MscS/CtMscCG (b).

Tab. 14 Leitfähigkeit von MscS und MscS/CtMscCG in *E. coli* MJF465 Sphäroplasten. Die Leitfähigkeit wurde durch Auftragung der Strom-/Spannungsverhältnisse und linearer Regression errechnet.

Konstrukt	Leitfähigkeit je Ionenflussrichtung [nS]	
	positiv	negativ
MscS	~1,25	~0,85
MscS/CtMscCG	~1,25	nicht messbar

Neben einer unveränderten Leitfähigkeit war auch die für die Aktivierung benötigte Druckschwelle durch die Fusion unbeeinflusst. Für die Berechnung der zur Öffnung benötigten Drucks, wurde als Referenz in *E. coli* MJF431 konstitutiv exprimierte MscL verwendet (Abb. 37). Die Fusion der 247 C-terminalen Aminosäuren an MscS hatte keine signifikante Veränderung des Druckschwellenwerts zur Folge (t-test mit $p < 0,05$; Abb. 37c). Die nach Fusion und damit Anwesenheit der zusätzlichen C-terminalen Domäne von MscCG gemessenen erhöhten Glutamatexkretion, lässt sich also durch eine Veränderung der Leitfähigkeit oder für das *gating* benötigten Änderung der Membranspannung nicht begründen.

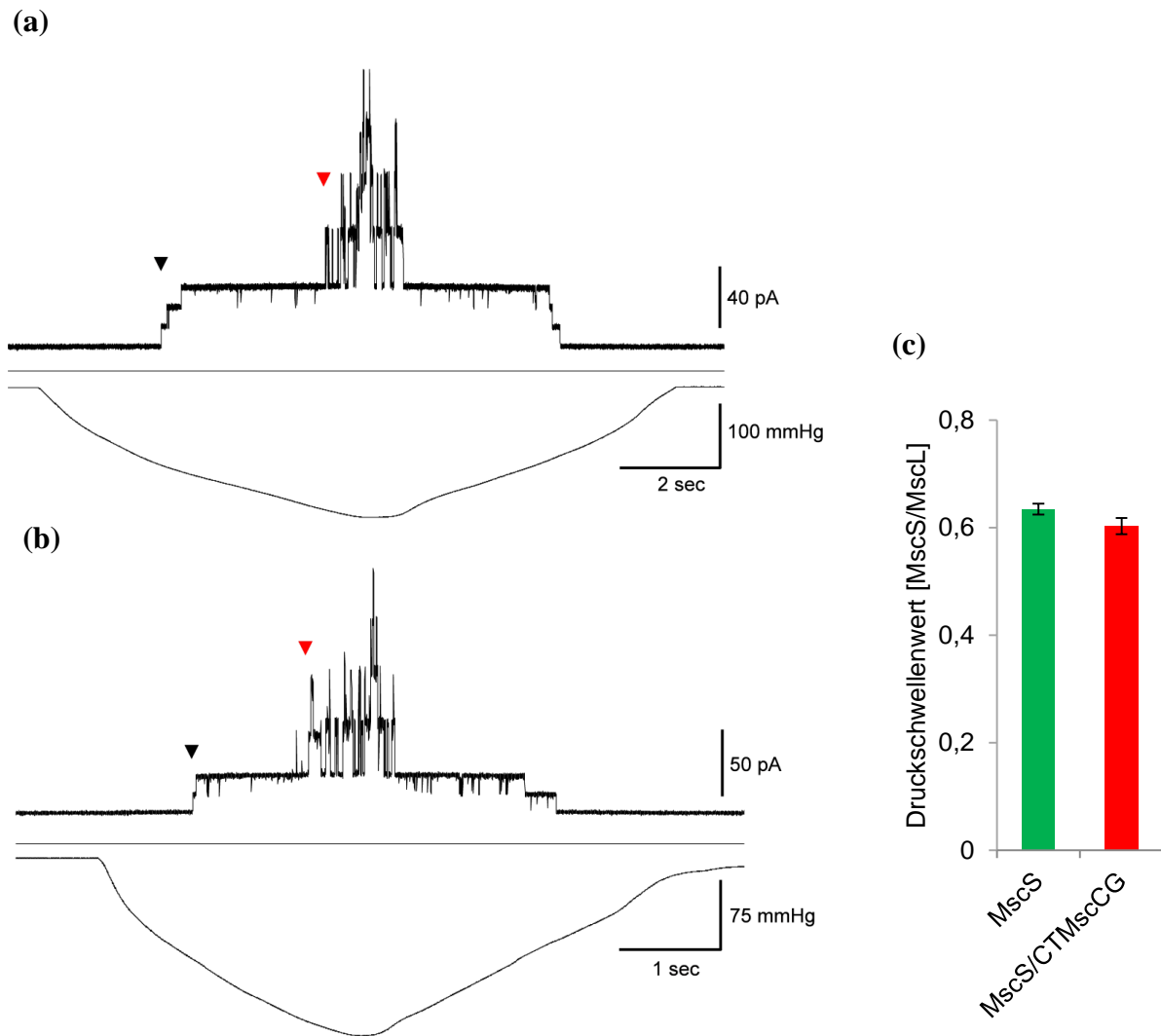


Abb. 37: Kanalaktivität von MscS (a), MscS/CtMscCG (b) und MscL in *E. coli* MJF 431 Sphäroplasten, sowie Druckschwellenwert beider Kanäle im Verhältnis zu MscL (c) Patch-clamp-Aufnahmen der Kanalaktivitäten erfolgten bei einer Spannung von +30 mV an *E. coli* MJF431 Sphäroplasten nach Plasmid-kodierter Expression von MscS und MscS/CtMscCG, unter asymmetrischen Pufferbedingungen. Dargestellt ist die Stromspur und der angelegte Druck in der Pipette. MscS- (a) und MscS/CtMscCG-Aktivität (b) kann bei geringerem Druck im Vergleich zu MscL beobachtet werden. Die Pfeile indizieren die erste Öffnung von MscS (a) und MscS/CtMscCG (b) (▼), sowie MscL (▼). Druckschwellenwerte stehen im Verhältnis zu MscL und zeigten keinen signifikanten Unterschied. (c) (t-test mit $p < 0,05$, Mittelwert \pm Standardfehler, $n \geq 5$).

3.2.3 Einfluss konservierter Bereiche der C-terminalen Domäne von MscCG

Die unterschiedlichen Verkürzungen von MscCG, aber auch die Fusion der zusätzlichen Domäne von MscCG haben gezeigt, dass die C-terminale Domäne eine Rolle beim Effluxverhalten spielt. Bisherige Beobachtungen nach Verkürzung deuten darauf hin, dass der periplasmatische Teil dieser Domäne wahrscheinlich keine Funktion besitzt. Die An- bzw. Abwesenheit der vierten Transmembrandomäne und damit eingeschlossen die Aminosäuren 287-423, führten zu deutlichen Veränderungen der Glutamataxkretion sowie der Fähigkeit Betain zu akkumulieren.

Ein Sequenzvergleich der zusätzlichen C-terminalen Domäne offenbarte, dass einige Motive in der Familie der *Corynebacteriaceae* stark konserviert sind (Abb. 46). So ähneln sich die Aminosäuresequenzen der vierten Transmembrandomäne deutlich und Bereiche vor dieser Domäne sind hoch konserviert. Zur detaillierten Analyse der Funktion dieser Abschnitte wurde die vierte Transmembrandomäne mutiert oder deletiert und konservierte Bereiche der Domäne deletiert oder durch Alanin-Linker ersetzt.

Die Verkürzung von MscCG um 110 AS resultierte in einer spontanen Exkretion von Glutamat. Detaillierte Mutationsanalysen dieses Konstrukts sollten zusätzlich Aufschluss über die Funktion von MscCG, als auch die Beteiligung bestimmter Bereiche der C-terminalen Domäne geben.

3.2.3.1 Einfluss der vierten Transmembrandomäne

Verkürzte Varianten, denen die vierte Transmembrandomäne fehlte, zeigten bei starker Expression keine spontane Exkretion von Glutamat, sowie den Verlust der Fähigkeit zur Betainakkumulation nach einem hypoosmotischen Schock unter nachfolgenden hyperosmotischen Bedingungen (3.2.1). Um eine mögliche Beteiligung bzw. die Rolle der Integrität dieser Domäne aufzuzeigen, wurde die vierte Transmembrandomäne bzw. die Aminosäuren 406-423 deletiert (MscCG Δ 406-423-His) oder mit einem Alanin-Linker gleicher Länge ersetzt (MscCG_Ala406-423-His). Die Expression der Konstrukte erfolgte unter Verwendung von 25 μ M IPTG in *C. glutamicum* Δ mscCG (Abb. 38).

Eine spontane Glutamataxkretion war trotz massiver Expression in beiden Fällen nicht zu beobachten (Abb. 39a). Die Penicillin-vermittelte Exkretion von Glutamat unterschied sich mit einer Rate von 19,2 μ mol g ZTM⁻¹ min⁻¹ nicht wesentlich von der des Wildtyps oder nach Überexpression von MscCG-His (Abb. 39b, Tab. 15). Die Deletion oder der Austausch

der vierten Transmembrandomäne hatte somit keinen Einfluss auf die Penicillin-vermittelte Exkretion von Glutamat.

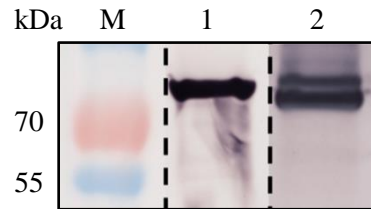


Abb. 38: Western Blot-Analyse von MscCG Δ 406-423-His und MscCG_Ala406-423-His. Die Plasmid-kodierte, Expression erfolgte unter Zugabe von 25 μ M IPTG in *C. glutamicum* Δ mscCG. SDS-Gele wurden mit jeweils 25 μ g Membranextrakt beladen und der Blot mit Anti-Penta-His Antikörper entwickelt. Größenstandard (M), MscCG Δ 406-423-His (1) und MscCG_Ala406-423-His (2).

Im Gegensatz zum unveränderten Kanal, resultierte die massive Expression von MscCG in Abwesenheit der vierten Transmembrandomäne nicht in einer spontanen Glutamatexkretion (Abb. 39)a. Diese Beobachtung deckt sich mit dem Ausbleiben einer spontanen Exkretion von Glutamat nach Expression verkürzter Derivate von MscCG, bei denen diese Transmembrandomäne ebenfalls fehlt (3.2.1). Offenbar spielt der periplasmatische Anteil der C-terminalen Domäne keine wesentliche Rolle, da ein Fehlen der AS 406-423 (TM4) die spontane Exkretion bereits verhindert. Die durch Penicillin ausgelöste Exkretion wird durch diese Modifikation nicht beeinflusst (Abb. 39b).

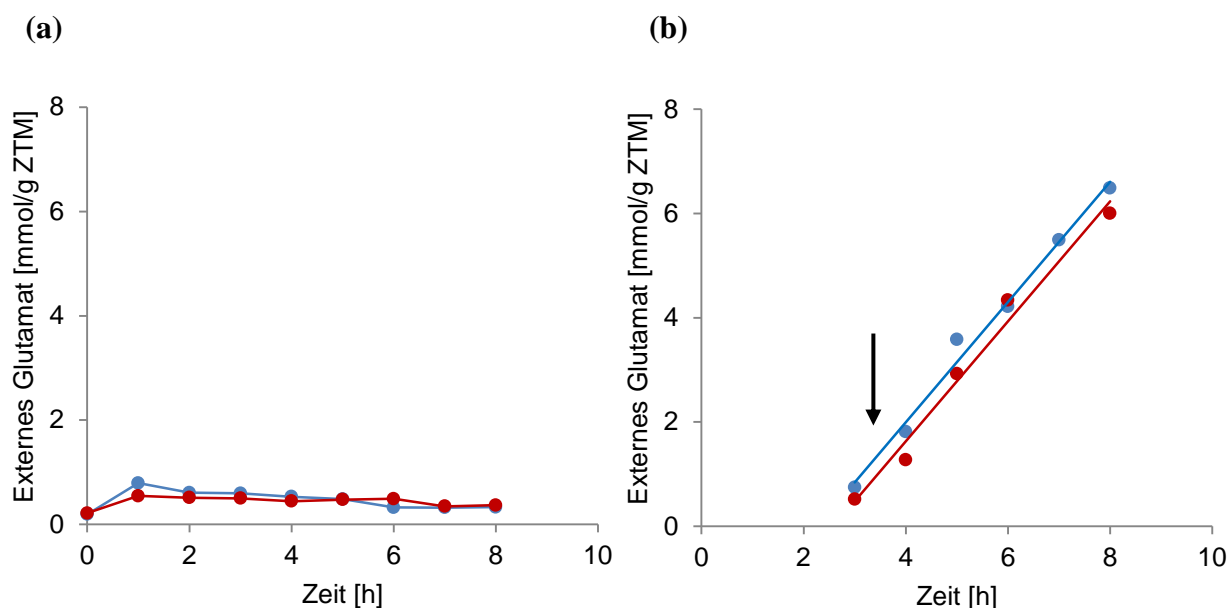


Abb. 39: Externe Glutamatkonzentration ohne Penicillin (a) und nach Auslösen der Exkretion mittels Penicillin (b) bei starker Expression von MscCG Δ 406-423-His und MscCG Δ Ala406-423-His. Dargestellt ist die Konzentration von Glutamat nach unterschiedlichen Zeitpunkten in externem Medium. Die Glutamatkonzentration wurde mittels HPLC bestimmt. Die Zugabe von Penicillin ist durch einen Pfeil markiert, wobei Geraden lineare Regressionen repräsentieren (b). Die Plasmid-kodierte und starke Expression erfolgte durch Zugabe von 25 μ M IPTG. MscCG Δ 406-423-His (●) und MscCG Δ Ala406-423-His (●).

Tab. 15: Glutamatexkretionsraten von MscCG-Derivaten mit Modifikation der vierten Transmembrandomäne. Die Glutamatexkretionsraten wurden mittels linearer Regression der externen Glutamatkonzentrationen ermittelt. Die Induktion der Expression der Konstrukte erfolgte unter Verwendung von 25 μ M IPTG.

Stamm/ Konstrukt	Glutamatexkretionsrate [μ mol g ZTM $^{-1}$ min $^{-1}$]	
	ohne Penicillin	mit Penicillin
MscCG Δ 406-423-His	0	19,2
MscCG Δ Ala406-423-His	0	19,2
WT	0	16,9 \pm 1,1
Δ mscCG	0	3,4 \pm 0,12

Die Integrität der vierten Transmembrandomäne scheint also notwendig, um eine spontane Exkretion bei starker Expression hervorzurufen. Dabei ist festzuhalten, dass auch bei der um 110 AS verkürzten Variante, die bereits bei schwacher Expression eine spontane Exkretion zeigt, die Aminosäuren 406-423 vorhanden sind.

Die Modifikation des Transmembranbereichs hatte außerdem einen Einfluss auf die Fähigkeit, nach hypoosmotischem Schock Betain zu akkumulieren. So waren Zellen nach

Expression von MscCG_Ala406-423-His nicht mehr in der Lage, nach hypoosmotischem Schock, unter hyperosmotischen Bedingungen Betain zu akkumulieren (Abb. 40). Die Zugabe eines Überschusses unmarkierten Betains verdeutlichte den massiven Efflux von Betain. BetP war hier nicht mehr in der Lage den massiven Efflux durch aktive Aufnahme zu kompensieren, was auf ein unter diesen Bedingungen verringertes Membranpotential von 157 mV zurückzuführen ist.

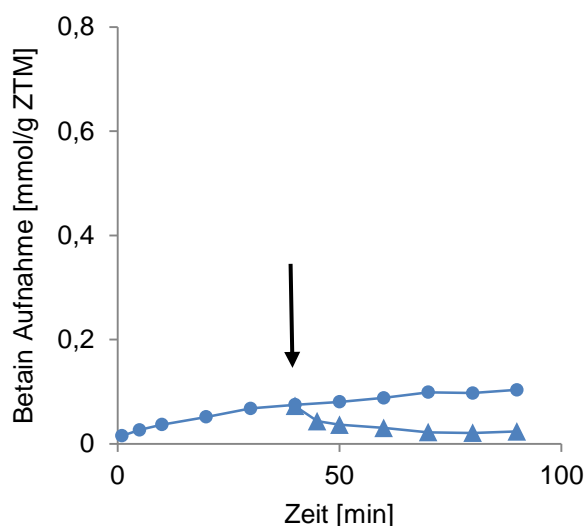


Abb. 40: Betainakkumulation und Efflux unter hyperosmotischen Bedingungen von MscCG_Ala406-423-His. Die Menge radioaktiv markierten Betains im Cytoplasma wurde mit schneller Filtration ermittelt. Die Zugabe eines Überschusses (50 mM) unmarkierten Betains (*chase* ▲) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die massive, Plasmid-kodierte Expression von MscCG_Ala406-423-His (●) in *C. glutamicum* Δ *mscCG* erfolgte durch Zugabe von 25 μ M IPTG.

Die Abwesenheit der vierten Transmembrandomäne führte demnach, wie auch bei Verkürzung, zu massiven Efflux von Betain nach hypoosmotischem Schock und verhinderte eine spontane Exkretion von Glutamat bei massiver Expression.

3.2.3.2 Untersuchungen zur Verkürzung von MscCG um 110 Aminosäuren

Die um 110 Aminosäuren verkürzte Variante von MscCG, deren geringe Expression bereits eine spontane Exkretion von Glutamat hervorruft, sowie die Akkumulation von Betain verhindert und zu einem sehr stark verringertem Membranpotential führt, endet C-terminal mit dem hydrophoben Bereich der vierten Transmembrandomäne. Dieser drastische Phänotyp lässt eine besondere Funktion dieser Domäne vermuten.

Zur detaillierten Analyse dieses Derivats, wurde eine um 110 AS verkürzte Variante erstellt, bei der die AS 406-423 durch Alanin ersetzt wurden (MscCG Δ 110_Ala406-423-His). Außerdem wurden die Aminosäuren 287-401 und damit der Bereich vor der Transmembrandomäne in zufälliger Reihenfolge durchmischelt, wodurch die Aminosäurekomposition und damit Länge, sowie Ladung erhalten blieben, sich die Reihenfolge aber unterschied (MscCG Δ 110_random287-401). Der C-terminale Transmembrananteil wurde dabei nicht verändert (Abb. 40).

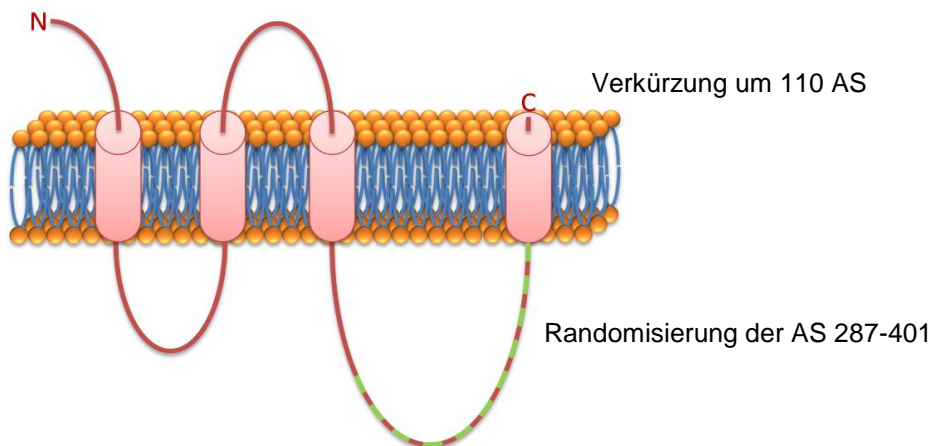


Abb. 41: Schematische Darstellung der Topologie von MscCG Δ 110. MscCG besitzt vier Transmembrandomänen, von denen die zweite und dritte, Poren-formende Domäne äußerst homolog zu MscS sind. Die vierte Transmembrandomäne bildet mit den Aminosäuren 406-424 den C-terminalen Bereich des trunkierten Konstrukts. Für die funktionelle Analyse des Bereichs vor der vierten Transmembrandomäne wurden die Aminosäuren 287-401 randomisiert (grün).

Des Weiteren wurden die für MscCG identifizierten LOF-Mutationen in das verkürzte Konstrukt eingeführt. Unter Verwendung von 25 μ M IPTG wurde alle Konstrukte in *C. glutamicum* Δ mscCG exprimiert und deren Effekt auf den Efflux von Glutamat und die Fähigkeit Betain nach hypoosmotischem Schock zu akkumulieren untersucht.

Ergebnisse

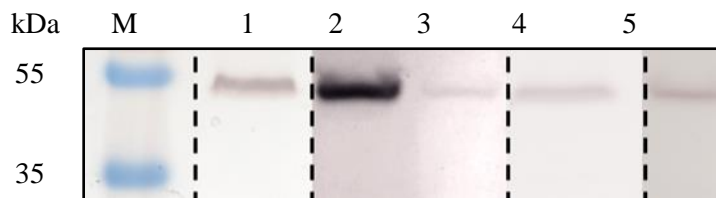


Abb. 42: Western Blot-Analyse von MscCG Δ 110-His und Derivaten. Die Expression von MscCG Δ 110-His und Derivaten erfolgte Plasmid-kodiert unter Verwendung von 25 μ M IPTG in *C. glutamicum* Δ mscCG. Mit Ausnahme von MscCG Δ 110_Ala406-423-His wurde zur Reduzierung der Expression kein IPTG verwendet. Für die SDS-PAGE wurden jeweils 25 μ g Membranextrakt verwendet (MscCG Δ 110-His: 40 μ g). Die immunologische Entwicklung erfolgte mittels Anti-Penta-His-Antikörper. Größenstandard (M); MscCG Δ 110-His + IPTG (1), MscCG Δ 110_Ala406-423-His + IPTG (2), MscCG Δ 110_Ala406-423-His ohne IPTG (3), MscCG Δ 110_Q112L_V115S-His + IPTG (4) und MscCG Δ 110_random287-401-His + IPTG (5).

Der Verlust des hydrophoben, vierten Transmembranbereichs mit den Aminosäuren 406-423 durch Substitution eines Alanin-Linkers, hob den drastischen Phänotyp der um 110 AS verkürzten Variante auf. Bei moderater Expression war weder ein vermindertes Wachstum, noch eine spontane Exkretion von Glutamat zu beobachten (Abb. 43). Die massive Überexpression hingegen führte erneut zu einer spontane Exkretion bei unverändertem Wachstum (Abb. 44).

Erstaunlicherweise zeigte sich in einem Kontrollexperiment, bei dem der Einfluss der hydrophoben Aminosäuren 403-426 auf die spontane Exkretion von Glutamat untersucht werden sollte, dass nicht nur dieser rudimentäre hydrophobe Bereich allein für die beobachteten Effekte verantwortlich ist. Nach Expression eines um 110 AS verkürzten Derivats von MscCG, bei dem der Bereich vor dieser Transmembrandomäne randomisiert wurde und der hydrophobe Bereich erhalten blieb, wurde überraschenderweise eine spontane Glutamatexkretion bei gleicher moderater Expression nicht mehr beobachtet (Abb. 43). Diese Randomisierung verhinderte also trotz Verkürzung um 110 AS die spontane Exkretion von Glutamat durch MscCG und weist direkt auf die regulatorische Rolle der C-terminalen Domäne hin.

Die durch Penicillin ausgelöste Exkretion wurde durch die Modifikation des Transmembranbereichs (AS 406-423) und der davor liegenden Segmente (AS 287-401) nicht beeinflusst. So konnte nach Zugabe von Penicillin bei Expression von MscCG Δ 110_Ala40-423-His und MscCG_random287-401-His eine Rate von 17,7 bzw 17,6 μ mol g ZTM⁻¹ min⁻¹ gemessen werden, die von der des Wildtyps oder nach Expression des unveränderten Kanals nicht signifikant abweicht. Das Einfügen der LOF-Mutationen verhinderte die durch die Expression von MscCG Δ 110-His hervorgerufene spontane Exkretion von Glutamat nicht. Die Manipulation der Pore dieses Konstrukts, die bei dem ungekürzten Kanal MscCG-His eine Exkretion komplett verhindert und auch die zur Aktivierung benötigten

Membranspannung herabsetzt, hatte bei der Trunkierung um 110 AS keinen Effekt. Diese Verkürzung muss demnach einen sehr starken Einfluss auf den Kanal haben. Dennoch wurden Zellen nach Expression des verkürzten Konstrukts durch das Einfügen der LOF-Mutationen befähigt Betain besser zu akkumulieren (Abb. 45), was auf einen verringerten Efflux nach hypoosmotischen Efflux aufgrund der eingefügten LOF-Mutationen hindeutet.

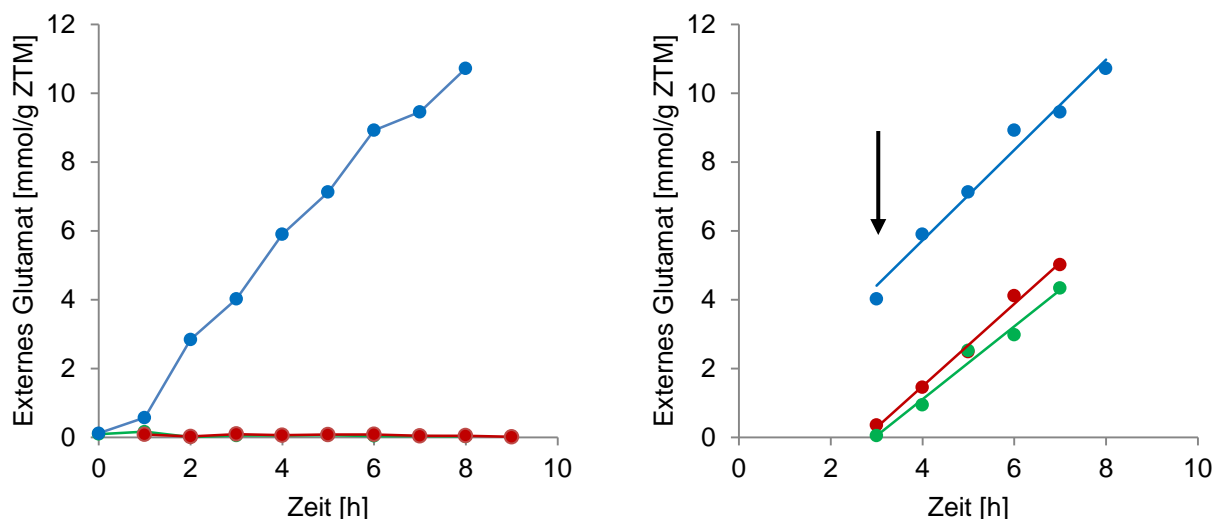


Abb. 43: Externe Glutamatkonzentration ohne Penicillin (a) und nach Auslösen der Exkretion mittels Penicillin (b) bei annähernd gleicher moderater Expression von MscCGΔ110-His-Derivaten. Dargestellt ist die Konzentration von Glutamat nach unterschiedlichen Zeitpunkten im externen Medium. Die Glutamatkonzentration wurde mittels HPLC analysiert. Die Zugabe von Penicillin ist durch einen Pfeil markiert, wobei Geraden lineare Regressionen repräsentieren (b). Die Plasmid-kodierte Expression von MscCGΔ110-His-Derivaten wurde durch Anpassung der IPTG-Konzentration auf ein moderates Niveau reguliert. MscCGΔ110_Q112L_V115S-His (●, mit 25 μM IPTG), MscCGΔ110_Ala406-423-His (●, ohne IPTG) und MscCGΔ110_random287-401-His (●, mit 25 μM IPTG).

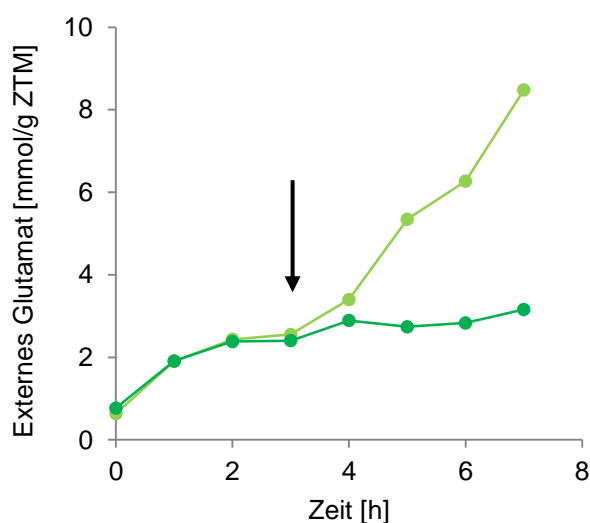


Abb. 44: Externe Glutamatkonzentration ohne Penicillin (●) und nach Auslösen der Exkretion mittels Penicillin (●) bei starker Expression von MscCGΔ110_Ala406-423-His. Dargestellt ist die Konzentration von Glutamat nach unterschiedlichen Zeitpunkten im externen Medium. Die Glutamatkonzentration wurde mittels HPLC analysiert. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt der Zugabe von 6 U/ml Penicillin. Die Plasmid-kodierte Expression von MscCGΔ110_Ala406-423-His erfolgte unter Zugabe von 25 μM IPTG.

Tab. 16: Glutamatkretionsraten von MscCGΔ110-Derivaten. Die Glutamatkretionsraten wurden mittels linearer Regression der externen Glutamatkonzentrationen ermittelt. Die moderate Expression der Konstrukte erfolgte unter Zugabe von 25 μM IPTG.

Stamm/ Konstrukt	Glutamatkretionsrate [$\mu\text{mol g ZTM}^{-1} \text{min}^{-1}$]	
	ohne Penicillin	mit Penicillin
MscCGΔ110_Ala406-423-His	0	17,7
MscCGΔ110_random287-401-His	0	18,1 ± 0,6
MscCGΔ110_Q112L_V115S-His	14,9 ± 0,6	20 ± 0,4
WT	0	16,9 ± 1,1
MscCGΔ110-His	15,2 ± 0,6	15 ± 1,9
ΔmscCG	0	3,4 ± 0,12

Tab. 17: Membranpotential von *C. glutamicum* ΔmscCG nach Expression von MscCGΔ110-His und Derivaten. Das Membranpotential wurde unter Verwendung von TPP ermittelt. Das Membranpotential ohne Schock wurde nach Wachstum unter hyperosmotischen Bedingungen in BHI mit 0,5 M NaCl (ca. 1,3 osmol/ kg) bestimmt. Außerdem wurden Die Potentiale nach einem hypoosmotischem Schock (ca. 0,1 osmol/kg), unter hyperosmotischen Bedingungen (ca. 1,8 osmol/kg) während der Betainakkumulation berechnet. Die Induktion der Expression erfolgte unter Verwendung von 25 μM IPTG.

Stamm/ Konstrukt	Membranpotential [mV]	
	BHI + 0,5 M NaCl	nach hypoosm. Schock
MscCGΔ110-His	157	168
MscCGΔ110_Ala406-423-His	201	201; 153*
MscCGΔ110_random287-401-His	187	198,4
MscCGΔ110_Q112L_V115S-His	180	207

*starke Überexpression mit 25 μM IPTG

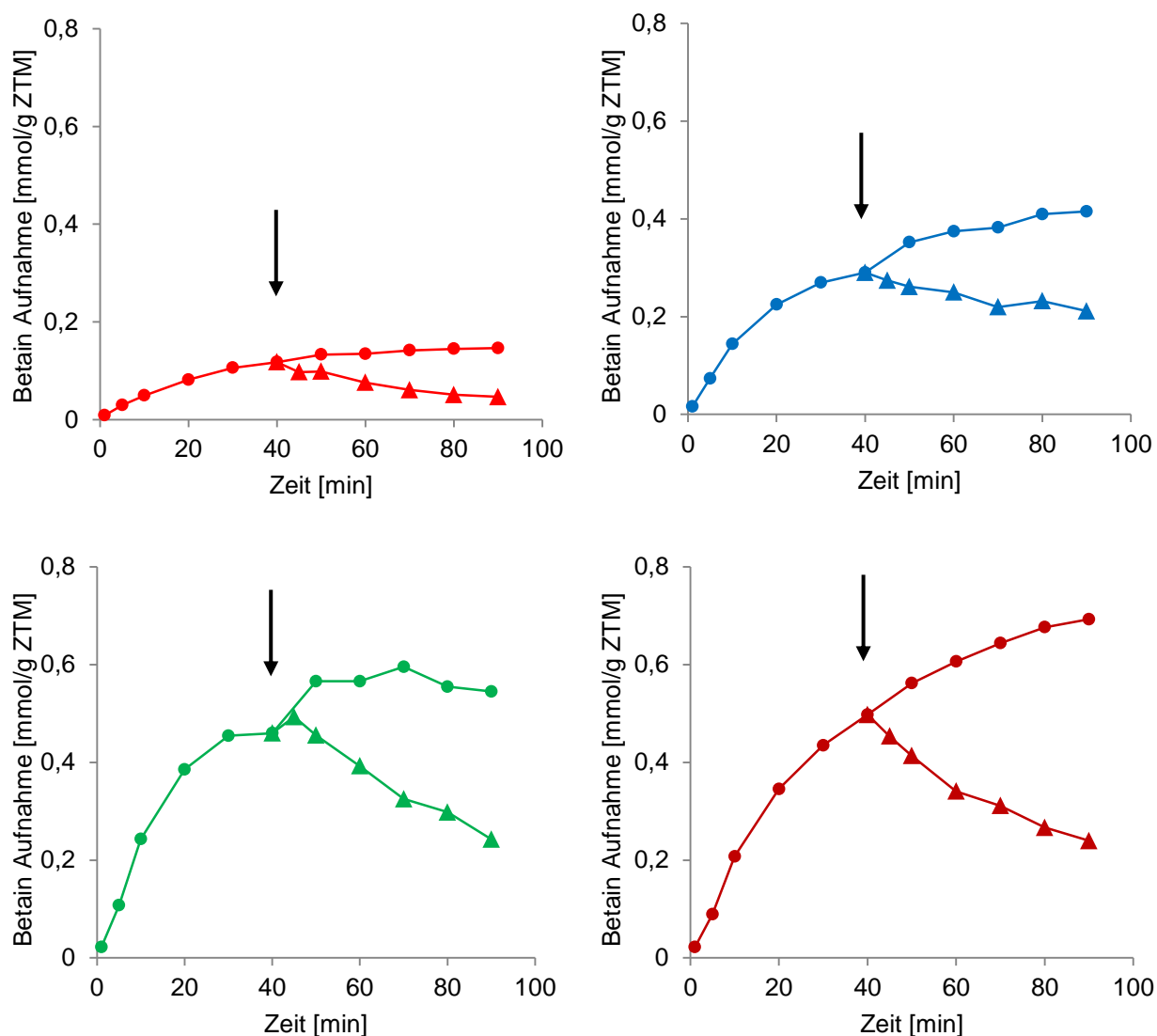


Abb. 45: Betainakkumulation und Efflux unter hyperosmotischen Bedingungen. Die Menge radioaktiv markierten Betains im Cytoplasma wurde mit schneller Filtration ermittelt. Die Zugabe eines Überschusses (50 mM) unmarkierten Betains (*chase*) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die moderate, Plasmid-kodierte Expression in *C. glutamicum* $\Delta mscCG$ erfolgte durch Zugabe von 25 μ M IPTG, wobei für moderate Expression von $MscCG\Delta110_Ala406-423-His$ hier ohne Zugabe von IPTG erfolgte. $MscCG\Delta110-His$ (●) nach *chase* (▲), $MscCG\Delta110_Q112L_V115S-His$ (●, mit 25 μ M IPTG) nach *chase* (▲), $MscCG\Delta110_Ala406-423-His$ (●, ohne IPTG) nach *chase* (▲) und $MscCG\Delta110_random287-401-His$ (●, mit 25 μ M IPTG) nach *chase* (▲).

3.2.2.3 Einfluss eines konservierten Bereichs vor der vierten Transmembrandomäne

Modifikationen bzw. Verkürzung des konservierten Bereichs vor und innerhalb der vorhergesagten vierten Transmembrandomäne haben gezeigt, dass diese offenbar eine Rolle für die Regulation von MscCG spielt und bei Abwesenheit dieser Domäne eine spontane Exkretion, sowie die Betainakkumulation nach hypoosmotischem Schock verhindert wird (3.2.1 und 3.2.2).

Verkürzungen, die über die vierte Domäne hinausgehen (MscCG Δ 141), sowie Modifikation dieses Bereichs (Ala406-423 und Δ 406-423) führen zu einer deutlichen Veränderung des Glutamatefflux sowie der Fähigkeit, Betain zu akkumulieren (Abb. 39 und Abb. 40). Zur detaillierten Analyse der möglichen Funktion dieses konservierten Motivs wurden die Bereiche mit den Aminosäuren 392-405, sowie 392-401 modifiziert. Dieser vorhergesagte Transmembranbereich umfasst 19 Aminosäuren (AS 402-420) und ist von hydrophilen, sowie teilweise ungeladen Aminosäuren umgeben (Abb. 46). Insbesondere der Bereich vor dieser Domäne ist hoch konserviert. Die Aminosäuren Methionin392, Serin393, Threonin394 und Serin395, die in der Transmembran-Vorhersage zu dem Transmembranbereich zählen, wurden dabei berücksichtigt.

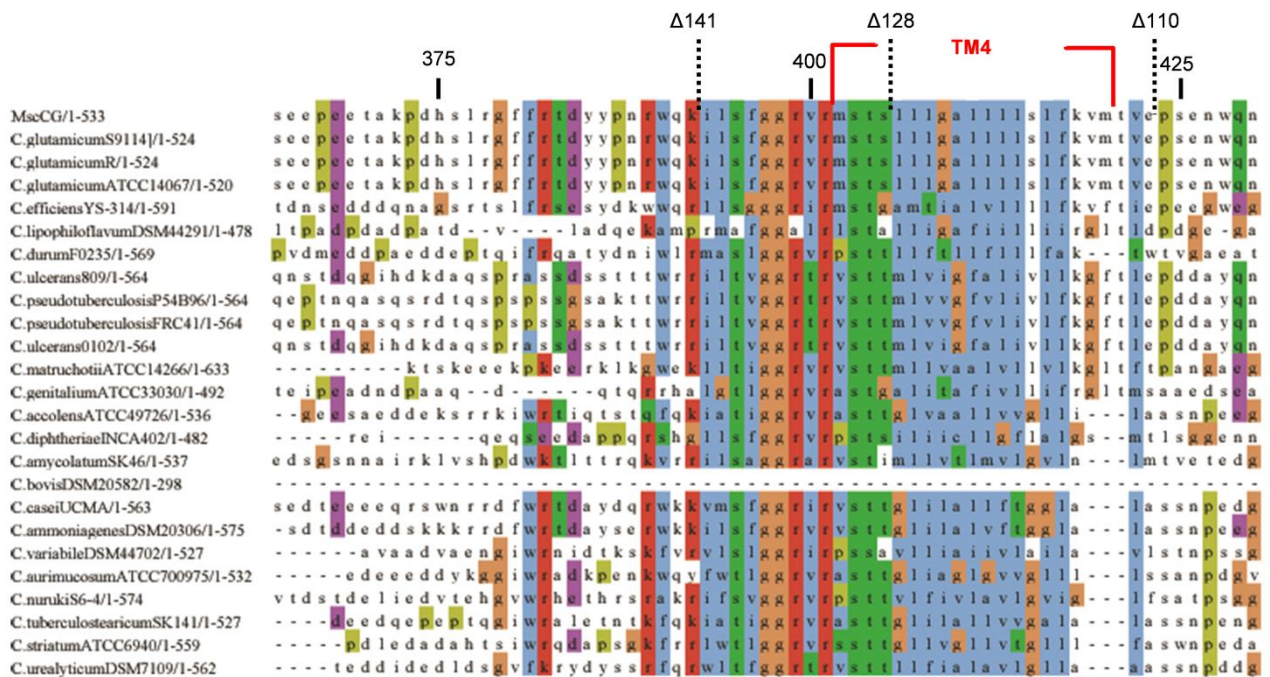


Abb. 46: Vergleich der Primärsequenz von MscCG aus *C. glutamicum* mit homologen Proteinen aus der Familie der *Corynebacteriaceae*. Dargestellt ist der Sequenzabschnitt um die vierte Transmembrandomäne von Aminosäure 364 bis 430. Die vorhergesagte Transmembrandomäne wird von den Aminosäuren 402-420 gebildet. Markiert sind außerdem Verkürzungsstellen innerhalb dieser Domäne (siehe Kapitel 3.2).

Dieser Bereich (AS 392-401 und 392-405) wurde deletiert, sowie durch einen Alanin-Linker gleicher Länge ersetzt und der Einfluss nach Expression in *C. glutamicum ΔmscCG* untersucht. Das Expressionslevel variierte nach Zugabe von 25 μ M deutlich (Abb. 47). Die massive Überexpression des Konstrukts (Abb. 47), bei dem die AS392-405 modifiziert waren, führte zu einer geringen, aber spontanen Glutamatexkretion. Dieser Effekt konnte durch Verringerung der Expression unterbunden werden (Abb. 48a und Tab. 19). Auch die Akkumulation von Betain war trotz moderater Expression deutlich beeinflusst (Abb. 49b). Im Gegensatz dazu führte die Modifikation bis zu AS 401, bei dem das ungeladene und hydrophile Motiv S-T-S und damit die vorhergesagte Transmembrandomäne erhalten war, zu keiner spontanen Exkretion. Ob der Bereich durch einen Linker ersetzt oder deletiert wurde, war dabei unbedeutend. Die Penicillin-vermittelte Exkretion von Glutamat bei moderater Expression war in beiden Fällen unverändert (Abb. 48 und Tab. 18).

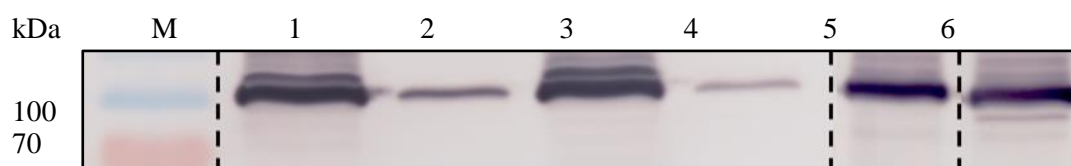


Abb. 47: Western Blot-Analyse von MscCG-Derivaten mit Modifikationen konservierter Motive. Die Expression von MscCG Δ 397-405-His und MscCG_{Ala}397-405-His erfolgte Plasmidkodiert unter Verwendung von 25 μ M IPTG in *C. glutamicum ΔmscCG*. Zur Verringerung der Expression erfolgte keine Zugabe von IPTG. Für die SDS-PAGE wurden jeweils 25 μ g Membranextrakt verwendet. Die immunologische Entwicklung erfolgte mittels Anti-Penta-His-Antikörper. Größenstandard (M); MscCG Δ 392-405-His + IPTG (1), MscCG Δ 392-405-His ohne IPTG (2) und MscCG_{Ala}392-405-His + IPTG (3), MscCG_{Ala}392-405-His ohne IPTG(4), MscCG Δ 392-401-His mit IPTG (5) und MscCG_{Ala}392-401-His mit IPTG (6).

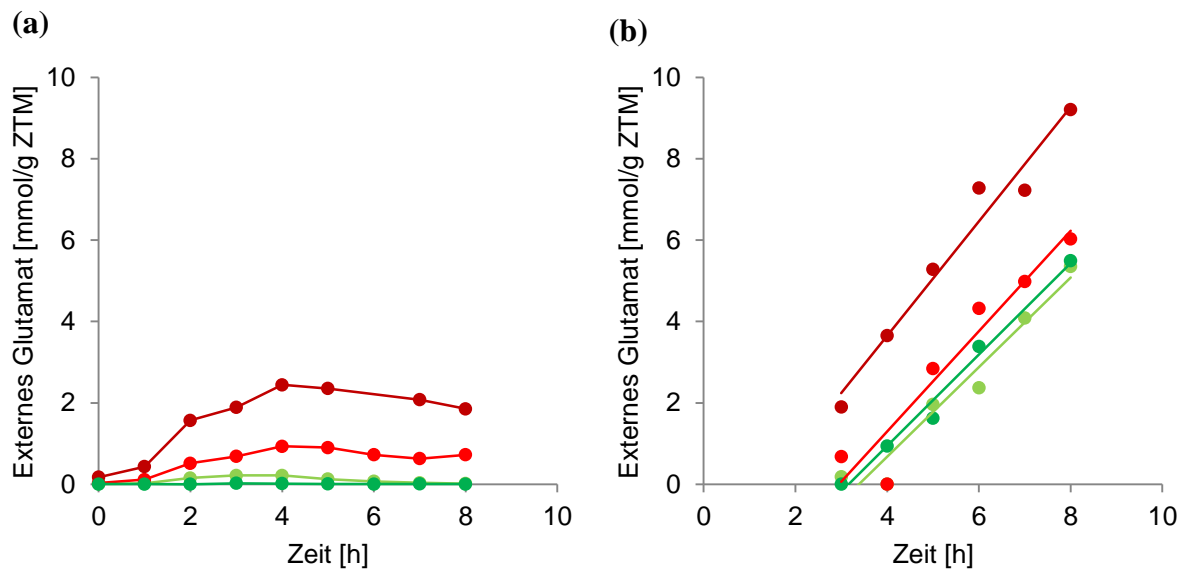


Abb. 48: Externe Glutamatkonzentration ohne Penicillin (a) und nach Auslösen der Exkretion mittels Penicillin (b) nach Expression mit 25 μ M IPTG von MscCG-His Derivaten. Dargestellt ist die Konzentration von Glutamat nach unterschiedlichen Zeitpunkten im externen Medium. Die Glutamatkonzentration wurde mittels HPLC analysiert. Die Zugabe von Penicillin ist durch einen Pfeil markiert, wobei Geraden lineare Regressionen repräsentieren (b). Die Plasmid-kodierte Expression von MscCG-Derivaten wurde Zugabe von 25 μ M IPTG induziert. MscCG Δ 392-401-His (\bullet), MscCG_Ala392-401-His (\bullet), MscCG Δ 392-405-His (\bullet) und MscCG_Ala392-405-His (\bullet).

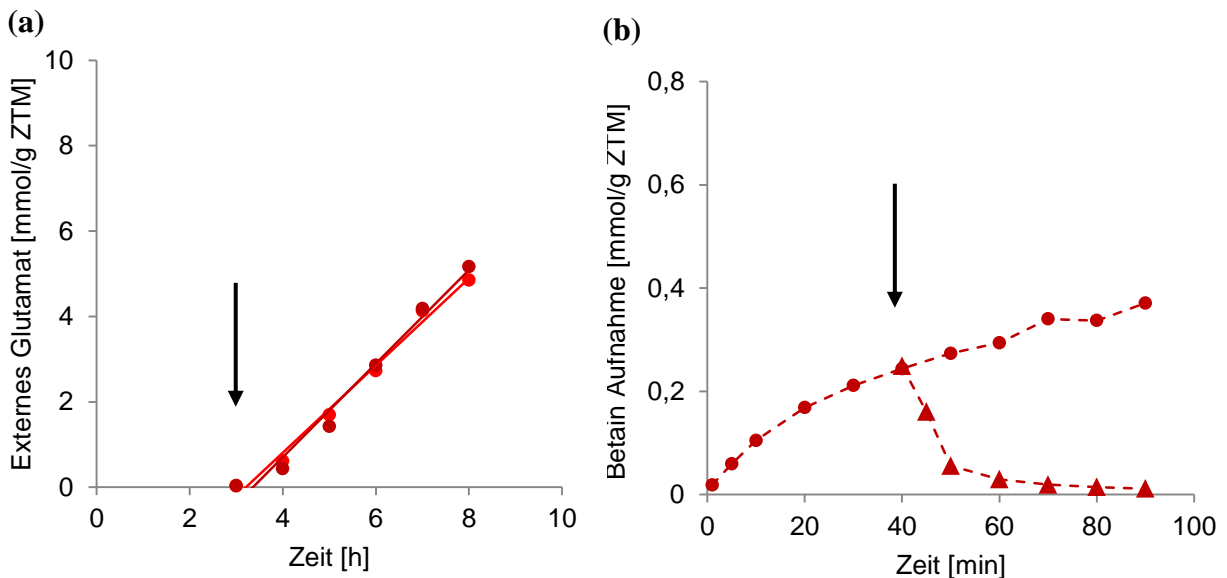


Abb. 49a: Externe Glutamatkonzentration nach Auslösen der Exkretion mittels Penicillin nach moderater Expression von MscCG_Ala392-405-His und MscCG_Δ392-405-His. Dargestellt ist die Konzentration von Glutamat nach unterschiedlichen Zeitpunkten in externem Medium. Die Glutamatkonzentration wurde mittels HPLC analysiert. Die Zugabe von Penicillin ist durch einen Pfeil markiert, wobei Geraden lineare Regressionen repräsentieren. Die moderate, Plasmid-kodierte Expression erfolgte ohne Zugabe von IPTG. MscCG Δ 392-405-His (\bullet) und MscCG_Ala392-405-His (\bullet). **Abb. 49b: Betainakkumulation und Efflux unter hyperosmotischen Bedingungen nach moderater Expression von MscCG_Ala392-405-His.** Die Betainakkumulation erfolgte unter hyperosmotischen Bedingungen nach hypoosmotischem Schock. Die Menge radioaktiv markierten Betains im Cytoplasma wurde mit schneller Filtration ermittelt. Die Zugabe eines Überschusses (50 mM) unmarkierten Betains (*chase* \blacktriangle) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die moderate, Plasmid-kodierte Expression von MscCG_Ala392-405-His (\bullet) in *C. glutamicum* Δ mscCG erfolgte ohne Zugabe von IPTG.

Tab. 18: Glutamatrekretionsraten von MscCG-Derivaten. Die Glutamatrekretionsraten wurden mittels linearer Regression der externen Glutamatkonzentrationen ermittelt. Die Expression der Konstrukte erfolgte unter Zugabe von 25 μ M IPTG.

Stamm/ Konstrukt	Glutamatrekretionsrate [μ mol g ZTM ⁻¹ min ⁻¹]	
	ohne Penicillin	mit Penicillin
MscCG Δ 392-401-His	0	18,4
MscCG_Ala392-401-His	0	18,7
MscCG Δ 392-405-His	3,9 (0-4 h)	20,6
MscCG_Ala392-405-His	10 (0-4 h)	19,8 (0-8h)
WT	0	16,9 \pm 1,1
Δ mscCG	0	3,4 \pm 0,12

Tab. 19: Glutamatrekretionsraten nach moderater Expression von MscCG Δ 392-405-His und MscCG_Ala392-405-His. Die Glutamatrekretionsraten wurden mittels linearer Regression der externen Glutamatkonzentrationen ermittelt. Die moderate Expression der Konstrukte erfolgte ohne Zugabe von IPTG.

Stamm/ Konstrukt	Glutamatrekretionsrate [μ mol g ZTM ⁻¹ min ⁻¹]	
	ohne Penicillin	mit Penicillin
MscCG Δ 392-405-His	0	17
MscCG_Ala392-405-His	0	18,3
WT	0	16,9 \pm 1,1
Δ mscCG	0	3,4 \pm 0,12

Insgesamt scheint die Integrität des Transmembranbereichs und auch der davor liegenden Aminosäuren von großer Bedeutung zu sein, da auch bei moderater Expression die Modifikation dieses konservierten Bereichs von AS 392-405 zu einer verminderten Fähigkeit, aufgrund eines sehr starken Efflux, Betain nach hypoosmotischem Schock zu akkumulieren, führte (Abb. 49b).

4. Diskussion

4.1 Die Funktion von MscCG in *Corynebacterium glutamicum*

Bakterielle Zellen sind jederzeit mit Veränderungen ihrer Umgebung konfrontiert, die sie bewältigen müssen. Eine der drastischsten Veränderungen ist eine plötzliche Änderung der externen Osmolalität. Um eine rapide Verringerung der externen Osmolalität bewältigen zu können, aktivieren bakterielle Zellen mechanosensitive Kanäle in ihrer Cytoplasmamembran. Ohne diesen Schutzmechanismus würde der osmotische Gradient zu einem Einstrom von Wasser und damit zur Lyse der Zellen führen. Mechanosensitive Kanäle sind als Notventil in der Lage, Veränderungen der Membranspannung wahrzunehmen und durch Öffnung akkumulierte kompatible Solute freizusetzen. Die meisten Bakterien besitzen Kanäle von mindestens einer Familie von mechanosensitiven Kanälen der MscS- oder MscL-Familie. In *C. glutamicum* wurden bisher die mechanosensitiven Kanäle MscL der MscL-Familie sowie MscCG der MscS-Familie identifiziert, deren osmoregulierter Efflux von kompatiblen Soluten 1997 identifiziert (Ruffert *et al.*, 1997) und ihre mechanosensitiven Eigenschaften später auch elektrophysiologisch gezeigt werden konnten (Nottebrock *et al.*, 2003; Ruffert *et al.*, 1999).

C. glutamicum ist einer der wichtigsten Organismen in der industriellen Biotechnologie zur Produktion von Aminosäuren. So beträgt die weltweite Produktion von L-Glutamat mit *C. glutamicum* ca. 2,5 Mio. Tonnen pro Jahr (Becker und Wittmann, 2012). Trotz Kenntnissen zur Optimierung und Modifikation von Stämmen zur Produktion von Glutamat war der Exportmechanismus zunächst unbekannt. Vor einigen Jahren wurde der Export von Glutamat zum ersten Mal mit dem mechanosensitiven Kanal NCgl1221 von *C. glutamicum* ATCC 13869, einem Protein der MscS-Familie und einem Homolog von MscCG in Verbindung gebracht. Mutationen des mechanosensitiven Kanals führten zu einem Efflux von Glutamat, ohne vorherige Induktion durch die Limitation von Biotin oder Zugabe von Penicillin G, während die Deletion diese verhinderte (Nakamura *et al.*, 2007).

MscCG besteht aus 533 Aminosäuren von denen die N-terminale Region (AS 1-286) Ähnlichkeiten zu MscS von *E. coli* (286 AS) aufweist (Abb. 5). Dieser Bereich beinhaltet drei Transmembrandomänen, von denen die dritte stark konserviert ist und in MscS die Pore des Kanals bildet (Bass *et al.*, 2002). Zusätzlich besitzt MscCG eine einzigartige, zusätzliche

C-terminale Domäne von 247 Aminosäuren, für die eine vierte Transmembrandomäne vorhergesagt wird. Diese zusätzliche Domäne kann ausschließlich innerhalb der Familie der *Corynebacteriaceae* gefunden werden und scheint eine besondere Funktion einzunehmen.

Eine intensivere Analyse der Topologie offenbarte, dass MscCG tatsächlich eine vierte Transmembrandomäne besitzt und der C-Terminus somit im Cytoplasma lokalisiert ist. Elektrophysiologische Messungen zeigten außerdem, dass MscCG charakteristische Eigenschaften eines Membranspannungs-aktivierten Kanals besitzt und nicht nur als Notventil bei hypoosmotischem Stress agiert sondern auch eine Rolle bei der Feinabstimmung der internen Solutkonzentration bei aktiver Aufnahme von Betain durch BetP unter hyperosmotischen Bedingungen einnimmt (Börngen, 2009; Börngen *et al.*, 2010).

4.2 Die Exkretion von Glutamat wird von MscCG vermittelt

Die bisherigen Beobachtungen zeigten, dass MscCG für den Export von Glutamat essenziell ist. Dennoch war bisher nicht eindeutig geklärt, ob Glutamat tatsächlich die Pore von MscCG passiert und somit direkt für den Efflux verantwortlich ist oder als Regulator die Aktivierung eines unbekanntem Exporters als Folge der Behandlung mit Penicillin oder einer Biotin-Limitierung vermittelt.

Zur Überprüfung des Efflux via MscCG bieten sich zwei Ansätze an. So erlauben einerseits Mutationen in der Pore eine direkte Beeinflussung des mechanosensitiven Kanals und damit Rückschlüsse, wie in diesem Kapitel nachfolgend diskutiert, auf die Freisetzung von Glutamat durch die Pore *in vivo*. Andererseits ermöglicht eine funktionelle Rekonstitution des isolierten Kanals in Proteoliposomen eine eindeutige Aussage über die Exkretion via MscCG in einem definierten System. Die Rekonstitution von MscCG unter Anwendung verschiedener Methoden führte leider zu keiner eindeutigen Aussage über den Efflux via MscCG. Die durchgeführten Versuche wurden deshalb im Ergebnis nicht erwähnt, werden jedoch nachstehend kurz diskutiert.

Für die elektrophysiologische Charakterisierung von mechanosensitiven Kanälen wie MscS und MscL sind diverse Methoden etabliert, mit denen Liposomen erstellt werden können, die eine elektrophysiologische Untersuchung der rekonstituierten Kanäle erlauben (Battle *et al.*, 2009; Criado und Keller, 1987; Delcour *et al.*, 1989; Häse *et al.*, 1995; Sukharev, 2002). Die standardmäßige Methode (Dehydration/Rehydration) zur Rekonstitution von mechanosensitiven Kanälen ist eine Abwandlung einer 1987 etablierte Methoden, bei der Asolectin-Proteoliposomen $MgCl_2$ ausgesetzt werden und damit die Bildung unilamellare

Liposomen „blister“ aus multilamellaren Proteoliposomen erlaubt. Diese Liposomen ermöglichen eine giga- Ω -Versiegelung zwischen der Mikropipette und der Lipiddoppelschicht zu erzeugen, um kleinste Ströme durch Aktivierung der mechanosensitiven Kanäle zu messen. Eine schnelle und einfachere Methode ist die Verwendung von Sucrose (Battle *et al.*, 2009).

Die Isolierung durch Solubilisierung von MscCG-His zur Rekonstitution erfolgte mit dem Detergens DDM zunächst nach heterologer Expression in *E. coli*. Die standardmäßige Rekonstitution des isolierten Kanals erfolgte sowohl mit Asolectin mittels Dehydration/Rehydratation also auch der Sucrose-Methode. Trotz Modifikation einiger Parameter, wie dem Protein/Lipid-Verhältnis und der Inkubationszeit zur Entfernung des Detergens, konnten in diesen Liposomen keine Kanalaktivitäten festgestellt werden. Auch die homologe Expression in *C. glutamicum* und anschließende Isolation und Rekonstitution ermöglichte keine Messung von MscCG-Aktivität. In Kontrollexperimenten konnte sowohl nach heterologer als auch homologer Expression von MscS hingegen Kanalaktivitäten in *patch-clamp* Experimenten von Liposomen aufgenommen werden. Oft ist die Lipidzusammensetzung der Cytoplasmamembran von großer Bedeutung für die Aktivität von Membranproteinen wie BetP (Schiller *et al.*, 2006) oder auch mechanosensitiven Kanälen wie MscS und MscL (Nomura *et al.*, 2012). Da die Cytoplasmamembran von *C. glutamicum* hauptsächlich aus Phospholipiden mit sauren Kopfgruppen besteht, die eine negative Nettoladung besitzen (Özcan *et al.*, 2007), kann die Ladung der Lipide die Funktion und Aktivität oder sogar den Einbau der rekonstituierten Proteine beeinflussen. Asolectin besteht zu 25 % aus PC, welches in der nativen Membran von *C. glutamicum* nicht vorhanden ist. Daher wurde in weiteren Versuchen die Lipidkomposition in verschiedensten Kombinationen modifiziert und auch *E. coli*-Lipidextrakt verwendet. Die Cytoplasmamembran von *E. coli* unterscheidet sich insbesondere durch die Anwesenheit von ca. 70% PE, 5% Cardiolipin und 18% PG (Romantsov *et al.*, 2009). Auch die Verwendung von *E. coli*-Lipidextrakt ermöglichte keine Kanalaktivität rekonstituierten MscCG, obwohl die elektrophysiologische Charakterisierung in *E. coli*-Sphäroplasten möglich war. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass MscS in Liposomen aus *E. coli* Lipidextrakt nicht aktivierbar ist und die Verwendung einer Zell-gleichen Lipidkomposition keine Garantie für die Aktivierung mechanosensitive Kanäle in Liposomen ist. Die Anwesenheit negativ geladener Lipide erschwerte in diesen Versuchen die Formierung unilaminarer Liposomen zusätzlich. Trotz verschiedenster Modifikationen konnte keine Kanalaktivität von MscCG gemessen werden.

Nach Quervernetzung von isoliertem MscCG mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor[®] 488, konnten die markierten Kanäle in der Membran lokalisiert werden (nicht abgebildet). Die Rekonstitution war demnach erfolgreich, jedoch wurde keine Aktivität aufgezeichnet. Die Lipidkomposition scheint ein wichtiger Faktor für die funktionelle Rekonstitution von MscCG zu sein. So können rekonstituierte MscS-Kanäle in Liposomen aus *E. coli*-Lipidextrakt nicht aktiviert werden (pers. Mitteilung, T. Nomura und B. Martinac) und wurde in elektrophysiologischen Kontrollexperimenten beobachtet. Die Fusion von Membranvesikel mit Liposomen aus PC oder Asolectin führte zu stabilen Vesikeln, die mit Carboxyfluorescein oder radioaktiv markiertem Glutamat gefüllt werden konnten. Ein MscCG-vermittelter Efflux konnte nach hypoosmotischem Schock aber nicht beobachtet werden. Bereits minimale Änderungen der Konformation sind für die Funktionalität von mechanosensitiven Kanälen entscheidend. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei der Solubilisierung, also dem Übergang der Proteine in Detergens-Mizellen Änderungen ausgelöst werden, die eine irreversible Konformationsänderung hervorrufen und so die Aktivierung der Kanäle verhindern. MscCG könnte aufgrund seiner besonderen Struktur durch die zusätzliche Domäne besonders sensibel gegenüber derartigen Änderungen sein.

Ein alternativer Beweis für die Exkretion von Glutamat durch MscCG ist die Identifikation von Mutationen in der Pore, die zu einem Funktionsgewinn als auch Funktionsverlust (*gain-* also auch *loss-of-function*) bezüglich der Exkretion von Glutamat führen. Dabei ist der Begriff des Funktionsgewinns für mechanosensitive Kanäle unterschiedlich zu interpretieren. So kann ein *gain-of-function*-Phänotyp einen negativen Einfluss auf die Zelle haben, wenn ein erleichtertes Öffnen der mechanosensitiven Kanäle zu einer Verringerung der Überlebensrate führt. In dieser Arbeit sind sowohl *gain-* als auch *loss-of-function* auf die Fähigkeit bezogen, Glutamat zu exkretieren. Durch heterologe Expression von *E. coli* MscS in *C. glutamicum* Δ *mscCG* waren Zellen nach Zugabe von Penicillin in der Lage, Glutamat zu exkretieren. Dieser Effekt konnte durch Einfügen von bekannten MscS-LOF-Mutationen (Nomura *et al.*, 2006) unterdrückt und durch Einfügen bekannter MscS-GOF-Mutationen in der dritten Transmembrandomäne (Miller *et al.*, 2003a) spontan, hervorgerufen werden (Börngen, 2009). Aufgrund der Ähnlichkeit zu MscS, konnte eine Exkretion via MscCG vermutet werden.

Die dritte Transmembranhelix bildet als Heptamer die Pore des Kanals und ist in der MscS-Familie stark konserviert. Diese Domäne ist sehr eng in dem heptameren Komplex verpackt und bildet am engsten Punkt ein Durchmesser von 8-11 Å, der durch die Aminosäuren

Leu105 und Leu109 eine hydrophobe Versiegelung im geschlossenen Zustand bildet (Bass *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2003a; Miller *et al.*, 2003b). Die Helix ist insgesamt hydrophob und besitzt ein hoch konserviertes Motiv von aufeinanderfolgenden Glycin- und Alaninresten. Substitutionen hydrophober Reste in diesem Motiv (Ala106V und Leu109C) führten zu einer drastischen Verringerung von Wachstum und Überlebensrate nach hypoosmotischem Schock (Edwards *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2003a).

Die äquivalente Substitution von Ala106 und Leu109 in MscCG mit anschließender Überexpression in *C. glutamicum* Δ *mscCG* führte zu einer spontanen Exkretion von Glutamat. Zwar führte auch die Überexpression von MscCG-His zu einem spontanen Efflux, dieser war allerdings deutlich schwächer ausgeprägt (Abb. 8). Auch das Wachstum war durch die Mutation A106V deutlich beeinträchtigt, was nach Expression des unveränderten Kanals nicht beobachtet wurde. GOF-Mutationen zeichnen sich auch in *E. coli* durch eine Inhibierung des Wachstums der Zellen aus (Edwards *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2003a). Die Modifikation des Leucinrests 109, der zusammen mit Leu105 einen ungehinderten Efflux von Soluten ohne Auslöser (z.B. Penicillin) verhindert, führt zu einem *gating* bei geringerer Membranspannung. Es wird vermutet, dass aufgrund der Hydrophobizität dieser Reste ein Bereich entsteht, der nicht vollständig hydratisiert werden kann, wodurch bei Abwesenheit von Wasser, keine Ionen bei geschlossener Pore passieren können (Anishkin und Sukharev, 2009). Die Modifikation dieses Verschlusses erlaubt demnach Ionen, die Pore leichter zu passieren. MscS mit der GOF-Mutation A106V besitzt in der Kristallstruktur eine mutmaßlich geöffnete Konformation (Wang *et al.*, 2008). Diese Mutation führt zu einer Konformationsänderung, bei der die Leucinreste vom Zentrum der Pore nach außen rotiert sind und die TM3a-Helix nach außen verschoben ist. Dadurch werden die Verbindungsstellen benachbarter Glycin-Alanin Motive gebrochen. Mutationsanalysen zeigten dass die Interaktionen dieser Reste eine zentrale Rolle für den Übergang zwischen geschlossener und offener Form spielen (Edwards *et al.*, 2005).

In geschlossenem Zustand ist Ala106 gegen Gly108 der benachbarten Helix in der heptameren Konformation gerichtet. Die Seitenkette des Valins nach der Substitution A106V verhindert möglicherweise die Bewegung der Helix zu einer geschlossenen Konformation des Kanals und erleichtert damit eine Öffnung der Pore (Wang *et al.*, 2008). Unter Berücksichtigung der Ähnlichkeit der Porenregion von MscS und MscCG können das beeinträchtigte Wachstum und die spontane Glutamatexkretion durch MscCG_A106V-His demnach auf das modifizierte *gating*-Verhalten zurückgeführt werden und auf eine Freisetzung des Glutamats durch die modifizierte Pore geschlossen werden.

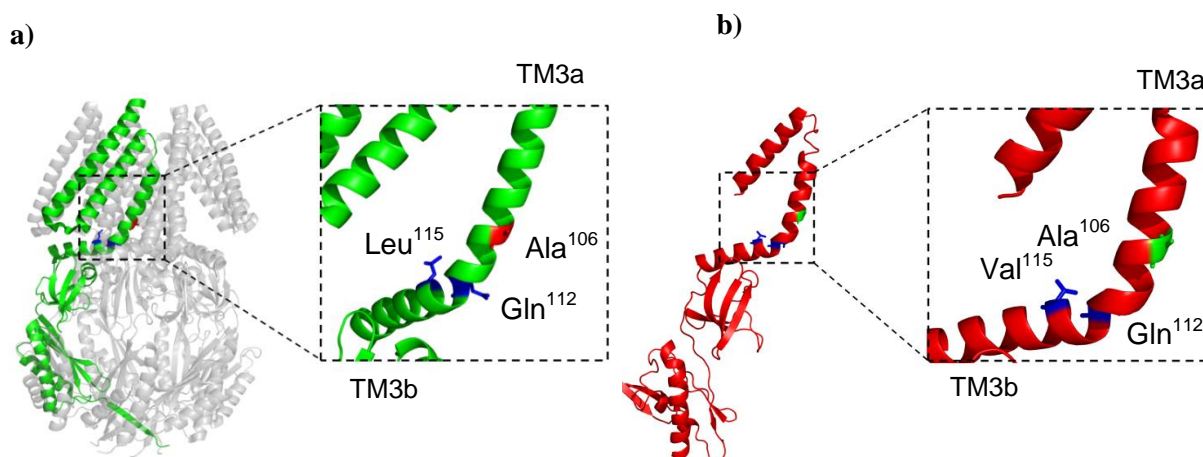


Abb. 50: Struktur von MscS (a) und des Modells von MscCG (b). Die Modellierung von MscCG erfolgte auf Basis der Struktur von MscS (2oau.pdb). Markiert sind die Aminosäuren deren Substitution in der dritten Transmembrandomäne von MscCG zu einem Funktionsgewinn (GOF: Ala106Val) oder Funktionsverlust (LOF: Gln112Leu und Val115Ser) führten.

In Übereinstimmung damit war außerdem die Fähigkeit der Betainakkumulation durch massiven Efflux von Betain beeinflusst (Abb. 10). Die Leitfähigkeit des Kanals war jedoch unverändert, wie auch für die äquivalente Mutation in MscS beobachtet wurde (Edwards *et al.*, 2005). Eine zuvor beobachtete, spontan ausgelöste Exkretion von Glutamat durch NCgl1221 von ATCCC 13869 mit den Mutationen A111V, A111T und A100T (Nakamura *et al.*, 2007) ist wahrscheinlich auf den gleichen Effekt der Manipulation der dritten Transmembrandomäne zurückzuführen.

Im Gegensatz zu GOF-Mutationen sind für MscS außerdem einige Mutationen beschrieben, die zu einem Funktionsverlust durch Anstieg der Aktivierungsschwelle, sowie Verringerung der Überlebensrate nach hypoosmotischem Schock von *E. coli* führen. So bedingen die Asparagin-Substitutionen A51N(TM1)/F68N(TM2) und I37N(TM1)/L86N(TM2) einen Anstieg der Aktivierungsschwelle und verringern die Überlebensrate nach hypoosmotischem Schock (Nomura *et al.*, 2006). Die Mutationen sind jeweils am cytoplasmatischen und periplasmatischen Ende der ersten und zweiten Transmembrandomäne lokalisiert und

beeinträchtigen eine Konformationsänderung der Porendomäne. Die Modifikationen unterbrechen die Protein-Lipid-Schnittstellen an den Enden der ersten und zweiten Transmembrandomäne und verhindern damit die Interaktion durch Unterbrechung der polaren/apolaren Schnittstelle. Es wird außerdem vermutet, dass die Verkürzung der hydrophoben Region, durch Substitution von hydrophoben Resten am Ende der Transmembranhelices, zu einer reduzierten Spannungssensitivität führen. Auch kann es aufgrund einer Asparagin-Substitution zu Strukturveränderungen des Proteins kommen, die eine Lipid-Protein-Interaktion an den Enden von TM1 und TM2 unterbinden. Es wird angenommen, dass die erste und zweite Transmembrandomäne Membranspannungen perzipieren und derart verschoben werden, dass eine Konformationsänderung über den TM1-TM2-Linker verursacht wird, was zur Öffnung der Pore durch Drehung führt. Diese Drehung wird benötigt, um den Übergang des geschlossen zu einem offenen Zustand zu verursachen (Booth und Blount, 2012).

Die Expression von MscS mit diesen Mutationen verhinderte eine von Penicillin ausgelöste Exkretion in *C. glutamicum* auf das Ausmaß, dass dem der Deletionsmutante entspricht (Börngen, 2009). Mittels Sequenzvergleiche und Modellierung von MscS auf Basis der Struktur von MscS wurden für MscCG äquivalente Aminosäuren identifiziert, deren Substitution einen ähnlichen Effekt erwarten ließ (Tab. 5).

Keines der in *C. glutamicum* Δ mscCG exprimierten Konstrukte mit Doppelmutation an den Enden der ersten und zweiten Transmembrandomäne verminderte die Glutamatexkretion nach Auslösen mit Penicillin. Wahrscheinlich unterscheiden sich die Protein-Lipid-Interaktionsstellen in MscCG von denen in MscS. Die erste Transmembrandomäne von MscCG weist im Gegensatz zu der zweiten und dritten Transmembrandomäne eine nur geringe Ähnlichkeit mit MscS auf. Die Modellierung dieser ersten Transmembrandomäne konnte nur durch Modifikationen der Ausgangssequenz erreicht werden (Abb. 6). Mögliche Interaktionsstellen, die für die Aktivierung und damit der Öffnung von MscCG benötigt werden, scheinen sich also zu unterscheiden oder einem anderen Mechanismus zu unterliegen.

Vor kurzem wurden LOF-Mutationen in MscS identifiziert, von denen polare Serin-Substitutionen in der dritten Transmembrandomäne zu einem drastischen Verlust der Überlebensrate von *E. coli*-Zellen nach hypoosmotischem Schock führten (Belyy *et al.*, 2010). Eine Kombination der Mutationen (F68S, L111S und L115S) führte zu einem Phänotyp der einer Deletion von MscS entspricht.

In dieser Arbeit konnten für MscCG entsprechende Aminosäuren identifiziert werden (Tab. 5), von denen die Mutation V115S in Verbindung mit der Substitution Q112V zu einem Verlust der Penicillin-ausgelösten Exkretion von Glutamat führte bzw. auf das Ausmaß der Deletionsmutante reduziert wurde. Die Orte der Substitution sind stark konserviert und Bestandteil der dritten Transmembranhelix (Abb. 50). Dieser Bereich formt in MscS interhelikale Kontaktstellen und nimmt die Rolle als Membranspannungsvermittelnde Komponente zur Öffnung durch Konformationsänderung ein. Glutamin112 und Valin115 befinden sich in der Transmembrandomäne 3b und werden daher möglicherweise für die Weiterleitung der mechanischen Kräfte und letztendlich der Öffnung der Pore benötigt. Die Modifikation der „Klammer“ bei Leucin113 verhindert also möglicherweise die Weiterleitung der Konformationsänderung durch Spannung auf den Rest des Proteins und verhindert dadurch das Passieren von Glutamat durch die Pore (Abb. 50).

Die eingefügten LOF-Mutationen in der Pore von MscCG hatten nicht nur einen Einfluss auf die ausgelöste Exkretion von Glutamat, sondern auch auf die Akkumulation von Betain unter hyperosmotischen Bedingungen nach einem hypoosmotischem Schock. Die Kultivierung in Vollmedium mit hoher Osmolalität und anschließendem hypoosmotischem Schock hatte für die Deletionsmutante *C. glutamicum* Δ *mscCG* eine verlangsamte Betainakkumulation zur Folge (Abb. 13). *C. glutamicum* Wildtyp wies hingegen eine schnellere Akkumulation bis zu einer Sättigung bei einer internen Konzentration von nahezu 0,8 mmol /g ZTM Betain nach bereits 40 min auf (Abb. 28). Wahrscheinlich besitzen Zellen von *C. glutamicum* Δ *mscCG* trotz des hypoosmotischen Schocks ausreichend Solute, die akkumuliert sowie synthetisiert und aufgrund des Fehlens des mechanosensitiven Kanals MscCG nicht exkretiert wurden.

Da die Zellen durch die Vorkultivierung mit ausreichend Kalium vorbeladen waren und der einzige BetP-stimulierende Faktor hier der osmotische Gradient war, ist eine langsamere Betain-Aufnahme wahrscheinlich auf den verringerten osmotischen Gradienten zurückzuführen. Trotzdem erreicht die akkumulierte Menge nach 90 min das Niveau des Wildtyps. Der zuvor beobachtete Efflux von aufgenommenen Betain (Börngen, 2009), wurde durch die Deletion unterbunden. Gleiches gilt nach Expression von MscCG-His mit eingefügten LOF-Mutationen. Offenbar ist der Kanal durch die Manipulation der dritten Transmembrandomäne, speziell des für die Weiterleitung der Konformationsänderung benötigten Teils, nach hypoosmotischen Schock nicht in der Lage akkumulierte Solute, wie aufgenommenes Betain zu exkretieren.

Die verminderte, aber konstante Aufnahme von Betain kann nicht durch ein vermindertes Membranpotential begründet werden. Dieses war bei der Deletionsmutante, als auch nach Expression des LOF-Konstrukts unverändert.

Patch-clamp-Experimente offenbarten, dass die Schwelle zur Aktivierung des Kanals sehr stark erhöht war (Abb. 14). Die Modifikation der Transmembranhelix führte demnach zu einer erschwerten Konformationsänderung und damit Öffnung des Kanals. Für Zellen bedeutet dies eine Verringerung der Überlebensrate nach hypoosmotischem Schock. Dies konnte nach Expression des LOF-Konstrukts in einer *E. coli*-Variante beobachtet werden, bei der vier mechanosensitive Kanäle fehlen. Durch heterologe Expression von MscCG waren Zellen in der Lage, den hypoosmotischen Schock bis zu einem gewissen Maß zu kompensieren. Nach Expression der LOF-Konstrukte waren die Zellen erneut nicht mehr in der Lage den hypoosmotischen Schock zu kompensieren, was sich in einer verringerten Überlebensrate äußerte (Abb. 15). In dieser Arbeit konnten LOF-Mutationen für MscCG identifiziert werden, die in einer verringerten Glutamatexkretion nach Auslösen mittels Penicillin führen. Dies kann durch eine erschwerte Öffnung des Kanals durch die Mutation der für das *gating* benötigten TM3 begründet werden. Im Gegensatz dazu führten GOF-Mutationen in MscCG zu einem spontanen Efflux von Glutamat durch ein wahrscheinlich erleichtertes Öffnungsverhalten des Kanals.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die von Penicillin ausgelöste Exkretion von Glutamat in *C. glutamicum* durch die Pore des mechanosensitiven Kanals MscCG vermittelt wird. Penicillin scheint dabei eine ähnliche Wirkung, wie die Änderung der Membranspannung bei hypoosmotischem Stress zu besitzen und den konstanten Efflux von Glutamat durch Konformationsänderung der Pore von MscCG hervorzurufen.

4.3 Die Integrität der C-terminalen Domäne ist für eine spontane Exkretion von Glutamat notwendig

Die von Penicillin ausgelöste Exkretion von Glutamat wird offenbar durch die Kerndomäne von MscCG vermittelt. Die Funktion der zusätzlichen Domäne war jedoch bisher unbekannt. Es gibt Hinweise, dass die zusätzliche C-terminale Domäne von 247 Aminosäuren einen bedeutenden Einfluss auf das *gating* und damit Exkretionsverhalten des Kanals hat. So führt eine C-terminale Verkürzung um 110 Aminosäuren zu einer spontanen Glutamatexkretion

und zu einem verringertem Wachstum, das wahrscheinlich auf ein verringertes Membranpotential durch unkontrollierten Efflux von Ionen zurückzuführen ist (Börngen, 2009; Nakamura *et al.*, 2007). Außerdem konnte eine durch Penicillin ausgelöste Glutamatexkretion via MscS durch die Fusion mit der zusätzlichen Domäne von MscCG, verstärkt werden. Zur Untersuchung der möglichen regulatorischen Funktion dieser Domäne, wurden Verkürzungen erstellt und der Einfluss deren Expression auf die Glutamatexkretion untersucht.

Die massive Überexpression von *mscCG*-His hatte eine spontane Exkretion von Glutamat zur Folge, die durch eine moderate Expression unterbunden werden konnte (Abb. 19). Ähnliche Beobachtungen wurden bei massiver Überexpression von verkürzten Varianten gemacht, bei denen der periplasmatische Rest nach der vierten Transmembrandomäne verkürzt wurde. Bei Verkürzungen, die über die vierte Transmembrandomäne hinausgingen, wurde trotz massiver Überexpression die spontane Exkretion von Glutamat unterbunden (Abb. 18). Die Integrität der zusätzlichen C-terminalen Domäne bis zum Ende der vierten Transmembranhelix (AS 287-423) scheint für einen spontanen Efflux bei massiver Überexpression also essenziell zu sein.

Für eine Penicillin-ausgelöste Exkretion scheint die Kanalregion mit den ersten drei Transmembrandomänen von MscCG zu genügen. So kann auch eine Exkretion von Glutamat mittels Penicillin ausgelöst werden, wenn MscCG auf die Länge von MscS (MscCG Δ 247) verkürzt wurde und die zusätzliche C-terminale Domäne fehlt. Lediglich die ersten drei Transmembrandomänen werden benötigt um den Reiz perzipieren. Es kann angenommen werden, dass der von Penicillin ausgelöste Mechanismus, der zur Konformationsänderung und damit Aktivierung der Kanäle führt von der Kanalregion mit den ersten drei Transmembrandomänen perzipiert und für die Konformationsänderung der Pore sorgt. Die Exkretionsrate ist dabei unabhängig vom Expressionslevel der Konstrukte. Bei Anwesenheit von Penicillin scheint eine maximale Exkretionsrate durch Schwächung der Zellen, die sich in einem verminderten Wachstum äußert, limitiert zu sein.

Elektrophysiologische Messungen zeigten, dass weder die Verkürzung auf die Länge von MscS, durch eine Trunkierung unmittelbar vor der vierten Transmembrandomäne (MscCG Δ 141), noch die Trunkierung um 110 AS eine Änderung der Leitfähigkeit zur Folge haben (Tab. 10). Die zusätzliche Domäne verursacht demnach keine direkte Modifikation der Porengröße, sondern eher eine Veränderung des *gating*-Verhaltens. Auch hier muss festgehalten werden, dass lediglich die N-terminale Domäne mit den drei Transmembrandomänen (MscCG Δ 247) benötigt wird, um eine Änderung der

Membranspannung zu perzipieren und eine Konformationsänderung zur Öffnung des Kanals auszulösen. Penicillin scheint also einen ähnlichen Mechanismus auszulösen, der für die Öffnung der Pore benötigt wird. Wahrscheinlich besitzt Penicillin eine ähnliche Wirkung auf die Änderung der Membranspannung, wie sie durch einen osmotischen Gradienten bei hypoosmotischem Schock hervorgerufen wird.

Die elektrophysiologische Messung zur Aktivierung und damit Messung der Leitfähigkeit von MscCG Δ 110 konnte nur in Anwesenheit von Gd^{3+} durchgeführt werden. Gd^{3+} -Ionen sind in der Lage mechanosensitive Kanäle zu blockieren und ihre Fähigkeit, mechanische Spannungen wahrzunehmen, zu reduzieren (Oliet und Bourque, 1996).

Die Funktionsweise von Gd^{3+} in Membranen ist noch nicht vollständig verstanden. Es wird vermutet, dass Gd^{3+} mechanosensitive Kanäle durch Verdichtung und Änderung des lateralen Drucks von anionischen Lipiden hemmt. So wurde gezeigt, dass rekonstituierte MscL von *E. coli* in Liposomen, die aus hauptsächlich negativ geladenen Lipiden bestehen, von Gd^{3+} vollständig blockiert werden können (Ermakov *et al.*, 2010). Dabei wird der Lateraldruck der Membran so erhöht, dass der Kanal zusammengedrückt und somit die geschlossene Konformation erzwungen wird. Letztendlich ist wahrscheinlich eine Änderung der lateralen Spannung in der Lipiddoppelschicht für eine Konformationsänderung und damit das *gating* des Kanals notwendig.

Ohne Gd^{3+} konnte keine Versiegelung des Membranpatch erlangt werden. In wenigen Messungen bei denen eine geringe giga- Ω -Versiegelung erlangt werden konnte, wurden spontane Kanalaktivitäten beobachtet ohne einer veränderten Membranspannung ausgesetzt zu sein (nicht abgebildet). Es kann vermutet werden, dass nur durch Blockierung der Kanäle mit Gd^{3+} eine spontanes *gating* unterbunden wurde und somit eine Stabilisierung der Membran erreicht werden konnte. Die Leitfähigkeit des Kanals wurde durch Gd^{3+} nicht beeinflusst, wie in einem Kontrollexperiment mit unmodifiziertem MscCG gezeigt wurde. Diese Beobachtung deutet erneut auf die Rolle der zusätzlichen Domäne hin. Die Verkürzung dieser Domäne um 110 AS führte zu einer derart deutlichen *gating*-Veränderung, dass spontane Kanalaktivitäten resultierten ohne die Porenstruktur zu verändern.

Die Wirkung von Gd^{3+} konnte auch *in vivo* gezeigt werden. So wurde die von Penicillin ausgelöste Exkretion von Glutamat nach Zugabe von Gd^{3+} deutlich reduziert (nicht abgebildet). Allerdings reduzierte sich auch die interne Glutamatkonzentration, sodass man neben der Blockierung von MscCG auch von einer verminderten Glucose-Aufnahme

ausgehen muss. Folglich eignete sich Gd^{3+} für die Blockierung von MscCG *in vivo* nur bedingt.

Der bedeutende Einfluss der zusätzlichen Domäne auf das *gating* wird nach Verkürzung um 110 Aminosäuren außerdem deutlich, wenn die zuvor identifizierten LOF-Mutationen in diese verkürzte Variante eingeführt werden. Die Modifikation der Pore genügte nicht, um eine spontane Exkretion zu verhindern. Die Modifikation der C-terminalen Domäne hat demnach einen derart starken Effekt, dass trotz erschwelter mechanischer Öffnung der Pore die Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht wird.

4.3.1 Der Einfluss der C-terminalen Domäne unter Berücksichtigung von MscCG Δ 110

Ein Hinweis auf die Bedeutung der zusätzlichen C-terminalen Domäne wird nach Verkürzung um 110 Aminosäuren deutlich. Wie bereits zuvor für NCgl1221 beobachtet (Nakamura *et al.*, 2007), hat die Verkürzung der vierten Transmembrandomäne einen derartigen Einfluss, dass ein spontaner Efflux bei sehr schwacher Expression und ein damit verringertes Membranpotential hervorgerufen wird. Ein verringertes Wachstum ist typisch für GOF-Mutationen in MscS aufgrund eines nicht korrekt schließenden Kanals, bei dem ein unkontrollierter Efflux von Ionen ein verringertes Membranpotential hervorruft.

In elektrophysiologischen Experimenten war die Leitfähigkeit des um 110 AS verkürzten Kanals unverändert, was auf eine unveränderte Porenkonformation hindeutet, obgleich eine *giga- Ω -seal* zur Messung einzelner Kanalaktivitäten nur unter Verwendung von Gd^{3+} möglich war. Die durch die Verkürzung hervorgerufenen Effekte konnten durch eingefügte LOF-Mutationen nicht unterbunden werden. Dies deutet auf die starke Wirkung einer möglichen Konformationsänderung und dem Einfluss der C-terminalen Domäne des Konstrukts hin. Die vierte Transmembrandomäne bildet mit den Aminosäuren 406-423 den C-terminalen Bereich und hat wahrscheinlich einen maßgeblichen Einfluss auf die Kanaldomäne. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Substitution dieses hydrophoben Sequenzbereichs mit einem Alanin-Linker bei moderater Expression (MscCG Δ 110_Ala406-423) die spontane Exkretion unterbindet (Abb. 43). Die massive Expression dieses Konstrukts (Abb. 42) führt allerdings zu einer ebenso spontanen, wenn auch nur schwachen Exkretion (Abb. 44), wie sie bei einer Verkürzung nach der vierten Transmembrandomäne beobachtet wurde (Tab. 8).

Dies lässt vermuten, dass allein das hydrophobe C-terminale Bereich, das von der vierten Transmembrandomäne gebildet wird, einen spontanen Efflux von MscCG Δ 110 verursacht.

Aufschluss darüber sollte eine Randomisierung ab Aminosäure 287 (MscS-Länge) bis zur Aminosäure 401 (unmittelbar vor der vierten Transmembrandomäne) geben. Bei dieser Randomisierung wurde die Aminosäureabfolge vollständig durchmischt, wobei die Nettoladung und Länge unverändert blieb. Der hydrophobe, C-terminale Bereich mit den Aminosäuren 402-423 blieb unverändert. Diese Randomisierung verhinderte die spontane Exkretion von Glutamat (Tab. 16). Offensichtlich ist nicht nur der hydrophobe Bereich für den drastischen Effekt verantwortlich. In einem Modell muss die Beteiligung des davor liegenden konservierten Bereichs berücksichtigt werden. So ist eine Beteiligung oder Interaktion der beiden Bereiche (TM4 und der davor liegende konservierte Bereich) vorstellbar, die eine derartige Konformationsänderung der Pore hervorruft, um sogar eine LOF-Mutation im Kanal zu überwinden und die durch Änderung des *gating*-Verhaltens beobachtete Glutamatexkretion hervorzurufen.

Neben der Verkürzung um 110 Aminosäuren verweist also auch die Randomisierung auf die Bedeutung der zusätzlichen C-terminalen Domäne und verdeutlicht ihre regulatorische Funktion bei der Exkretion von Glutamat. Dabei scheint die mögliche Interaktion die zu einer Konformationsänderung und damit zu verändertem *gating* führt, sehr spezifisch für die Kanalregion von MscCG zu sein. Die Verkürzung des Fusionskonstrukts MscS/CtMscCG-His um 110 Aminosäuren hatte keine Änderung des Exkretionsverhaltens zur Folge (Abb. 35 und Tab. 12). Möglicherweise kann hier eine Konformationsänderung aufgrund geringerer Ähnlichkeit der cytoplasmatischen Domäne und/oder der Kanalregion nicht erfolgen.

4.3.2 Bedeutung konservierter Regionen für den Einfluss der C-terminalen Domäne

Zur detaillierten Analyse der wahrscheinlich regulatorisch wirksamen C-terminalen Domäne, wurden Modifikationen in deren konservierten Bereichen (Abb. 46) vorgenommen. Die Deletion oder Substitution des Transmembranbereichs (Aminosäuren 406-423) verhinderte eine spontane Glutamatexkretion bei massiver Expression (Abb. 38). Die von Penicillin ausgelöste Exkretionsrate blieb wie auch bei allen verkürzten Derivaten unverändert. In Übereinstimmung mit trunkierten Varianten (Tab. 8), wird eine spontane Exkretion also durch das Fehlen der vierten Transmembrandomäne verhindert (Abb. 39). *Vice versa*, kann eine spontane Exkretion nur in Anwesenheit dieser Transmembrandomäne erfolgen, wie auch bei der um 110 Aminosäuren verkürzten Variante zu beobachten ist. Notwendig dafür ist allerdings auch die Anwesenheit des konservierten Bereichs vor TM4, wie in dem randomisierten Konstrukt MscCG Δ 110_random287-401-His beobachtet wurde

(Abb. 41). Indizien dafür liefern detailliertere Mutationsanalysen des konservierten Bereichs vor der vierten Transmembrandomäne mit den Aminosäuren 392-401 und 392-405 (Tab. 18). Alanin-Substitution bzw. Deletion des Bereichs mit den Aminosäuren 392-405 hat keinen Einfluss auf einen spontanen Efflux bei massiver Expression. In dieser Mutante ist der Transmembranbereich mit den Aminosäuren 406-423 präsent und das Protein damit in der Lage Glutamat spontan freizusetzen. Allerdings wird der spontane Efflux durch Manipulation des kleineren Bereichs mit den Aminosäuren 392-401 verhindert. In bioinformatischen Vorhersagen zählen die Aminosäuren 402-405 zu der vierten Transmembrandomäne. Das bedeutet, dass für einen spontanen Efflux der Transmembranbereich 406-420 intakt sein muss, was allerdings auch für den konservierten Bereich 392-401 gilt, wenn die Aminosäuren 402-405 anwesend sind. Aufgrund fehlender Strukturdaten kann nur vermutet werden, dass diese Bereiche für eine mögliche Konformationsänderung von MscCG notwendig sind. Welche strukturelle Rolle diesem Bereich zukommt bleibt spekulativ. Die starke Konservierung in der Familie der *Corynebacteriaceae* spricht jedoch für eine essenzielle Rolle (Abb. 46).

4.4 Einfluss der C-terminalen Domäne auf MscS

Auch die heterologe Expression von MscS erlaubt eine durch Penicillin ausgelöste Exkretion von Glutamat, wenn auch auf einem geringem Niveau (Abb. 31). Eine Wirkung von Penicillin auf MscS war bisher nicht bekannt und offenbart die Wirkung von Penicillin auf mechanosensitive Kanäle. Die Exkretion von Glutamat via MscS konnte sogar mittels Fusion der zusätzlichen Domäne gesteigert werden, ohne jedoch die Rate von MscCG zu erreichen (Abb. 31). Die elektrophysiologische Analyse zeigte, dass die Leitfähigkeit des Kanals dabei nicht beeinflusst wurde. Dies verdeutlicht erneut, dass die zusätzliche Domäne die Porenstruktur nicht beeinflusst, sondern wahrscheinlich einen Einfluss auf das *gating*-Verhalten besitzt. Die Ähnlichkeit der Kanalregion von MscS zu MscCG genügt demnach, das *gating* durch die C-terminale Domäne zu beeinflussen. Dabei scheint die Exkretion neben der Porengröße wahrscheinlich durch die Selektivität, vermittelt von der cytoplasmatischen Domäne oder *gating*-Schwelle des Kanals, limitiert zu sein. Es muss außerdem berücksichtigt werden, dass MscS im Gegensatz zu MscCG bei permanenter Spannung desensibilisiert bzw. inaktiviert wird (Akitake *et al.*, 2007), was sich in einer verminderten Exkretion widerspiegeln könnte. Unter der Prämisse, Penicillin vermittele eine

ähnliche Wirkung auf den Kanal wie eine osmostimulierte Änderung der Membranspannung, wird MscS nach wenigen Sekunden spontan inaktiviert. In *patch-clamp*-Messungen blieb MscCG bei anhaltender, erhöhter Membranspannung geöffnet, während MscS inaktiviert wurde und sich der Ionenstrom verringerte (nicht abgebildet). Der für die Inaktivierung von MscS verantwortliche Mechanismus ist noch nicht vollständig verstanden. Es ist bekannt, dass das konservierte Glycin113 für die Inaktivierung notwendig ist. Dieses Glycin befindet sich direkt im Knick zwischen TM3a und TM3b, der eine hydrophobe Interaktion zwischen F68 von TM2 und Leu111 und Leu115 der TM3 verhindert (Edwards *et al.*, 2008), während andere Reste von TM3b (Asn117 und Gly168) der cytoplasmatischen Domäne ein Abknicken unterstützen (Koprowski *et al.*, 2011). Veränderungen des Glycinrests verhindern eine Inaktivierung (Edwards *et al.*, 2008).

Das möglicherweise für die Inaktivierung benötigte Glycin113 fehlt in der sonst stark konservierten TM3 von MscCG und ist wahrscheinlich für die ausbleibende Inaktivierung verantwortlich, wie sie auch für andere Kanäle der MscS-Familie beobachtet wurden (Petrov *et al.*, 2013; Vásquez, 2013). Diese Adaption, also der Verlust der Leitfähigkeit bei anhaltender Änderung der Membranspannung, scheint in der MscS-Familie nicht evolutiv konserviert zu sein (Naismith und Booth, 2012), wobei die Bedeutung dieser Inaktivierung noch nicht vollkommen verstanden ist. Als sicher gilt, dass MscS im inaktivierten Zustand unempfindlich gegenüber erhöhter Spannungen ist. Hinweise auf einen Einfluss der fusionierten Domäne auf die Inaktivierung können nur spezifische elektrophysiologische Untersuchungen geben. Schwellenwert-Experimente zur Öffnung der Kanäle in Sphäroplasten zeigten, dass für die Aktivierung von MscCG eine geringere Membranspannung benötigt wurde als für MscS (Abb. 27 und Abb. 37). Der Reiz, der zur Aktivierung des Kanals in MscS benötigt wird, ist also deutlich höher als für MscCG und könnte eine weitere Erklärung für die im Vergleich zu MscCG geringere Exkretionsrate sein. Die verstärkte Exkretion durch die Fusion der zusätzlichen Domäne an MscS kann jedoch nicht durch eine Verringerung des Druckschwellenwerts begründet werden. So war dieser im Vergleich zu MscS in *E. coli* Sphäroplasten unverändert (Abb. 37). Insgesamt scheint die fusionierte C-terminale Domäne von MscCG also eher einen Einfluss auf das *gating*-Verhalten von MscS zu haben.

In *patch-clamp*-Experimenten mit dem Fusionskonstrukt konnten bei einer negativen elektrischen Spannung keine eindeutigen Einzelkanalöffnungen aufgezeichnet werden. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten elektrophysiologischen Experimenten lag die Membran in einer *inside-out*-Konfiguration vor, sodass Ionen bei angelegter negativer elektrischer

Spannung zuerst die fusionierte C-terminale Domäne passieren mussten. Bereits geringe Änderungen der Membranspannung führten unter diesen Bedingungen zu flackernden Kanalaktivitäten (Abb. 35). Dieses Verhalten könnte ein direkter Hinweis auf den Einfluss der zusätzlichen Domäne von MscCG sein.

Die cytoplasmatische Domäne besitzt neben einer distalen kleineren Pore, die mit hydrophoben Aminosäuren ausgekleidet ist und damit den einfachen Durchfluss von hydratisierten Soluten verhindert und die Pore effektiv verschließt, sieben Seitenporen mit einem Durchmesser von 7 Å (Wang *et al.*, 2008). In dynamischen Molekülsimulationen wurde beobachtet, dass K⁺- und Cl⁻-Ionen diese Poren passieren (Sotomayor und Schulten, 2004; Vora *et al.*, 2006). Diese Seitenporen bilden dabei die einzige Öffnung für die Freisetzung von Wasser und cytoplasmatischen Soluten in den extrazellulären Raum. Es wird vermutet, dass diese Poren im cytoplasmatischen Anteil von MscS als eine Art Sieb fungieren, die den Efflux von Osmolyten während der Öffnung des Kanals optimieren. Auf Basis diffusionstheoretischer Berechnungen und dynamischen Molekülsimulationen wird postuliert, dass diese Poren als Filter für Glutamat und K⁺-Ionen fungieren, um zur Abstimmung eines fast Ladungsneutralen Efflux von K⁺ und Glutamat führen. Dabei wird eine Depolarisation während der Öffnung reduziert und der Efflux von Glutamat kontrolliert (Gamini *et al.*, 2011). Dies erlaubt trotz Entfernung der cytoplasmatischen Domäne von MscS weiterhin die mechanosensitive Öffnung des Kanals (Schumann *et al.*, 2004), verringert aber die Überlebensrate nach hypoosmotischem Schocks aufgrund unkontrolliertem Efflux von negativ geladenen Ionen wie Glutamat (Sotomayor *et al.*, 2007). Die Fusion der zusätzlichen Domäne könnte Eigenschaften von MscS derart ändern, dass ein vermehrter Efflux von Glutamat hervorgerufen wird. So ist eine Änderung der selektiven Wirkung der cytoplasmatischen Domäne nach einer Fusion denkbar.

Wahrscheinlicher scheint jedoch eine Veränderung des *gatings* durch die Anwesenheit der zusätzlichen Domäne, etwa durch Interaktion mit der Kerndomäne, die eine Konformationsänderung hervorruft und sich dann in der elektrophysiologischen Messung in einem Flackern äußert. Wie bereits für MscCG diskutiert, könnte außerdem die nicht durchführbare funktionelle Rekonstitution des fusionierten Konstrukts auf den Einfluss der zusätzlichen C-terminalen Domäne zurückgeführt werden. Unabhängig der Expression von MscS in *E. coli* oder *C. glutamicum* war eine funktionelle Rekonstitution von MscS möglich. Generell scheint eine strukturelle Einflussnahme der zusätzlichen Domäne die Öffnungswahrscheinlichkeit und damit den vermehrten Efflux von Glutamat zu bedingen und die Funktion von MscS zu beeinflussen.

4.5 Die Bedeutung der C-terminalen Domäne für die Aufnahme kompatibler Solute unter hyperosmotischen Bedingungen

Einen detaillierteren Hinweis auf einen möglichen Regulationsmechanismus, vermittelt durch die zusätzliche C-terminalen Domäne von MscCG, liefern Messungen der Betainaufnahme und -Efflux nach hypoosmotischem Schock. So waren Zellen mit verkürzten Varianten, bei denen die vierte Transmembrandomäne fehlt nach einem hypoosmotischem Schock nicht mehr in der Lage, Betain zu akkumulieren (Abb. 29). Es kann vermutet werden, dass diese Kanäle nach einmaliger Aktivierung durch hypoosmotischen Stress nicht mehr in der Lage waren, adäquat zu schließen und das Schließverhalten beeinträchtigt war. Der Verlust aufgenommenen Betains, wurde in *chase*-Experimenten, bei dem die Zellen ein stark vermindertes Membranpotential aufwiesen, deutlich (Tab. 11).

Die Anwesenheit der vierten Transmembrandomäne erlaubt hingegen eine im Vergleich zum Wildtyp unveränderte Betainakkumulation bis zum *steady-state* (Abb. 28). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die zusätzliche Domäne inklusive der vierten Transmembrandomäne für das Schließen oder die Inaktivierung des Kanals notwendig, dass diese möglicherweise sogar direkt vermittelt. Damit würde diese auch die Regulation der Feinabstimmung der Betainakkumulation direkt beeinflussen.

Für MscS und andere Kanäle der MscS-Familie ist bekannt, dass sie bei konstantem Druck inaktiviert werden. Da MscCG ein Mechanismus zur Inaktivierung (MscS:Gly113, MscCG: Ser113) fehlt, kann das Schließen bei konstanter Membranspannung anders reguliert sein. Nach einem hypoosmotischem Schock sind Zellen also nicht mehr in der Lage, ohne TM4 die Inaktivierung des Kanals durchzuführen. Ein Mechanismus zur Inaktivierung scheint notwendig, da dieser bei *E. coli* mit MscS hilft, einen andauernden osmotischem Schock zu überleben (Boer *et al.*, 2011). Auch für MscL ist keine derartige Inaktivierung bekannt, stattdessen weist MscL ausschließlich einen offenen oder geschlossenen Zustand auf. Allerdings werden für MscL massivere Kräfte für die Aktivierung des Kanals benötigt, so dass dieser viel später als MscS geöffnet wird und demnach nur bei sehr stark osmotischem Schock aktiviert wird. MscCG ist im Vergleich zu MscS leichter zu öffnen und benötigt eine noch geringere Membranspannung (Abb. 27 und Abb. 37), was die Regulation der Inaktivierung noch notwendiger erscheinen lässt.

4.6 Modell zur Exkretion von Glutamat und einer Doppelfunktion der C-terminalen Domäne

Unter der Annahme, dass Penicillin zu einer dauerhaften Änderung der Membranspannung führt, wird die Exkretion von Glutamat aufgrund der mechanischen Öffnung des Kanals ausgelöst. Die An-oder Abwesenheit der TM4 ist dafür belanglos, da die Pore von MscCG auch geöffnet werden kann, wenn die zusätzliche Domäne fehlt (MscCG Δ 247). Hervorgerufene Membranspannungen könnten demnach so stark sein, dass die zusätzliche Domäne keinen Einfluss hat und eine annähernd unveränderte Exkretionsrate gemessen wird.

Jedoch scheint die Integrität der C-terminalen Domäne nicht nur eine Rolle bei der Inaktivierung, sondern auch bei der Regulation des Öffnungsverhaltens eine Rolle zu spielen. So wurde gezeigt, dass bei Abwesenheit der vierten Transmembrandomäne durch Verkürzung oder Deletion eine spontane Exkretion von Glutamat bei massiver Expression ausbleibt (Abb. 19), während bei Anwesenheit dieser Domäne eine spontane Öffnung hervorgerufen bzw. ermöglicht wird (Abb. 18).

Einen weiteren Hinweis für diese Doppelfunktion bei der Glutamatexkretion und Betainakkumulation liefert die Deletion der vierten Transmembrandomäne und die Alanin-Substitution der Aminosäuren 406-423 (Abb. 38). Bei massiver Expression wird keine spontane Exkretion beobachtet, die durch diese Domäne positiv beeinflusst werden könnte. Gleichzeitig sind Zellen nach Expression des Konstrukts nach hypoosmotischem Schock nicht mehr in der Lage, Betain zu akkumulieren (Abb. 40). Das korrekte Schließen nach osmotischem Schock kann nicht mehr erfolgen.

Möglicherweise kommt dieser additive Effekt auch nach Fusion von MscS mit der zusätzlichen Domäne von MscCG zutragen, da eine verstärkte Exkretion von Glutamat nach Fusion mit der C-terminalen Domäne hervorgerufen wurde (Abb. 31). MscS wird trotz anhaltender, erhöhter Membranspannung inaktiviert (Anishkin und Sukharev, 2009). Unter der Prämisse, dass Penicillin eine dauerhafte Änderung der Membranspannung hervorruft, ist die beobachtete erhöhte Exkretion möglicherweise eine Folge der Änderung des Öffnungsverhalten, hervorgerufen durch die fusionierte C-terminale Domäne. Interaktionen der zusätzlichen Domäne mit der Kanaldomäne, die über TM1 und TM2 dann mechanische Kräfte an TM3 weiterleiten, könnten so durch die vierte TM beeinflusst werden und eine Inaktivierung verhindern bzw. die Wahrscheinlichkeit einer Inaktivierung verringern. Die

Leitfähigkeit wäre bei diesem Regulationsmechanismus, wie in dieser Arbeit beobachtet, unverändert, da die Größe der Pore nicht beeinflusst wird.

Ein Effekt auf das Öffnungsverhalten wird außerdem durch den Efflux von Betain während der Betainakkumulation unter hyperosmotischen Bedingungen deutlich. Dieser wurde in Verbindung mit BetP als Mechanismus zur Feinabstimmung der internen Betainkonzentration identifiziert (Börngen, 2009). Für den Efflux von Betain unter hyperosmotischen Bedingungen muss das Öffnen des Kanals, unabhängig eines osmotischen Stimulus, vermittelt werden. Ein wichtiges Element der Regulation scheint die vierte Transmembrandomäne, sowie konservierte Bereiche davor einzunehmen.

Das Öffnungs- und Schließverhalten von mechanosensitiven Kanälen wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Als sicher gilt, dass Änderungen der Eigenschaften von Lipiddoppelschichten die Aktivität von Membranproteinen beeinflussen. So führen Längenunterschiede zwischen hydrophoben Transmembransegmenten von Membranproteinen und hydrophober Membranbereiche zu einem hydrophoben *mismatch* (Killian, 1998). Auch die intrinsische Biegung einer Membranschicht und die Fluidität der Membran beeinflussen die Aktivität von Membranproteinen. Der Einfluss der Fluidität auf eine Konformationsänderung von Membranproteinen kann jedoch wahrscheinlich vernachlässigt werden (Lee, 1998). So wurde der Einfluss der Fluidität auf die Exkretion von Glutamat ausgeschlossen (Lambert *et al.*, 1995). Jedoch haben Veränderungen des lateralen Druckprofils spezifische funktionale Effekte auf mechanosensitive Kanäle (Wiggins und Phillips, 2005). Änderungen des Druckprofils durch mechanische Kräfte oder Lipidverschiebung, durch z.B. amphiphile Verbindungen, führen zu einer energetisch günstigeren Konformation von Transmembranhelices, was zu einer Öffnung von mechanosensitiven Kanälen führen kann. So rufen verschiedene Anästhetika, Änderungen des Druckprofils der Lipiddoppelschicht hervor (Cantor, 1997), von denen ein direkter Einfluss von z.B. Procaine und Tetracaine auf die Aktivierung von MscS experimentell gezeigt wurde (Martinac *et al.*, 1990). Kräfte innerhalb der Lipiddoppelschicht oder innerhalb eines Proteins sind demnach in der Lage, die Konformation eines Kanals zu stabilisieren oder destabilisieren. Wahrscheinlich ist die ausgelöste Exkretion von Glutamat von *C. glutamicum* mittels lokaler Anästhetika (Lambert *et al.*, 1995) auf genau diesen Effekt zurückzuführen. Für MscL wird angenommen, dass ein spontanes *gating* ohne erhöhte Membranspannung nach Zugabe von Lysophosphatidylcholin (LPC) aufgrund seines amphiphilen Charakters und damit der Veränderung des lateralen Drucks hervorgerufen wird. Allein der hydrophobe *mismatch* reicht demnach nicht aus, um eine

Kanalöffnung zu bewirken (Perozo *et al.*, 2002). Andere Studien zeigen, dass bereits eine Krümmung der Membran genügt, um Konformationsänderungen hervorzurufen (Yoo und Cui, 2009).

In den letzten Jahren wurden viele Studien über das *gating* von mechanosensitiven Kanälen veröffentlicht, trotzdem ist die mechanistische Funktionsweise, die zur Aktivierung von mechanosensitiven Kanälen führt, noch immer nicht vollständig verstanden. Neueste Untersuchungen zeigen, dass neben Änderungen des hydrophoben *mismatch* und des lateralen Druckprofils, auch Abstände zwischen den Kanälen die strukturelle Dynamik beeinflussen, sodass die Aktivierungseigenschaften von mechanosensitiven Kanälen beeinflusst werden. Außerdem scheinen mechanosensitive Kanäle eine Tendenz zur Clusterbildung zu haben, in denen verringerte Abstände zwischen den Kanälen die Aktivierung von Kanälen beeinflussen (Nomura *et al.*, 2012). Auch in theoretischen Modellen wurde eine Änderung der Spannungssensitivität unter diesen Bedingungen vorhergesagt (Lindén *et al.*, 2012; Ursell *et al.*, 2011). Eine massive Überexpression von MscCG könnte demnach eine Clusterbildung der Kanäle hervorrufen und durch bisher unbekannte Interaktion der zusätzlichen C-terminalen Domäne mit der Kernregion oder durch Änderung der Lipidumgebung zu einer Aktivierung des Kanals führen, was in einer spontanen Exkretion von Glutamat resultiert. Die zusätzliche Domäne perzipiert dabei Reize in der Membran, um diese an die Transmembrandomänen der Kerndomäne weiterzuleiten (Abb. 52). Während die massive Expression in Anwesenheit der vierten Transmembrandomäne zu einer Aktivierung führt, hebt die Deletion der vierten Transmembrandomäne durch unterbleibende Reizweiterleitung, die spontane Aktivierung bei massiver Überexpression auf.

Für eine mit Penicillin ausgelöste Aktivierung von MscCG genügen die ersten drei Transmembrandomänen (MscCG Δ 247), um mechanische Kräfte, die von einer Deformierung der Lipiddoppelschicht durch Verhinderung der Zellwandsynthese ausgehen, zu perzipieren. Dabei ist der hydrophobe *mismatch* möglicherweise einer der Faktoren, die zu einem erleichterten Öffnen der Pore führen. Auch die Krümmung der Lipiddoppelschicht mit einhergehenden Änderungen des Druckprofils in *patch-clamp*-Experimenten, führen zu Konformationsänderungen der ersten und zweiten TM, die die mechanischen Kräfte auf die dritte TM übertragen und die Pore öffnen. Ein unter Verwendung von amphiphilen Verbindungen wie LPC oder Tetracain hervorgerufene Glutamatefflux kann wahrscheinlich auf eine ähnliche Aktivierung (Konformationsänderung) von MscCG durch Änderungen des lateralen Membrandrucks zurückgeführt werden.

Die von Penicillin hervorgerufene Änderung der Membranspannung wird von den Transmembrandomänen der Kerndomäne perzipiert und führt zu einer Öffnung der Pore, die von der dritten Transmembrandomäne gebildet wird. Dieser Mechanismus ermöglicht Penicillin möglicherweise auch die Freisetzung von Glutamat in *C. glutamicum* via MscS hervorzurufen, dessen drei Transmembrandomänen denen von MscCG ähneln. Modifikation der Porendomäne von MscCG verhindern (LOF) oder erleichtern (GOF) eine Konformationsänderung und damit das Öffnen der Pore zur Freisetzung von Glutamat durch Manipulation benötigter Interaktionsstellen benachbarter Domänen direkt in der heptameren Pore der dritten Transmembrandomäne.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die C-terminale Domäne eine regulatorische Funktion einnimmt und das *gating* von MscCG beeinflusst. Es ist denkbar, dass die vierte Transmembrandomäne das *gating* durch direkte Interaktion mit der Kanalregion als Folge von Änderungen der beschriebenen Eigenschaften der Lipidumgebung reguliert (Abb. 52). Die Lage und mögliche Interaktionsstellen der vierten Transmembrandomäne mit der Kerndomäne sind allerdings unbekannt und können nur spekuliert werden. Die Integrität konservierter Bereiche dieser Domäne scheint jedoch für eine Regulation von essenzieller Bedeutung. Die Verkürzung um 110 Aminosäuren führt ohne äußeren Reiz zu einer derart massiven Konformationsänderung der Kerndomäne, dass eine Aktivierung und damit offenbar unkontrollierte Exkretion von Glutamat hervorgerufen wird, die auch durch Modifikation der Porendomäne durch eine LOF-Mutation nicht unterdrückt werden kann. Wahrscheinlich werden mögliche Interaktionsstellen derart beeinflusst, dass eine Konformationsänderung zur Öffnung der Pore dauerhaft hervorgerufen wird (Abb. 51). Bei dieser Aktivierung scheint jedoch nicht nur die vierte Transmembrandomäne von Bedeutung, sondern auch konservierte Bereiche davor, da eine Randomisierung die spontane Aktivierung verhindert.

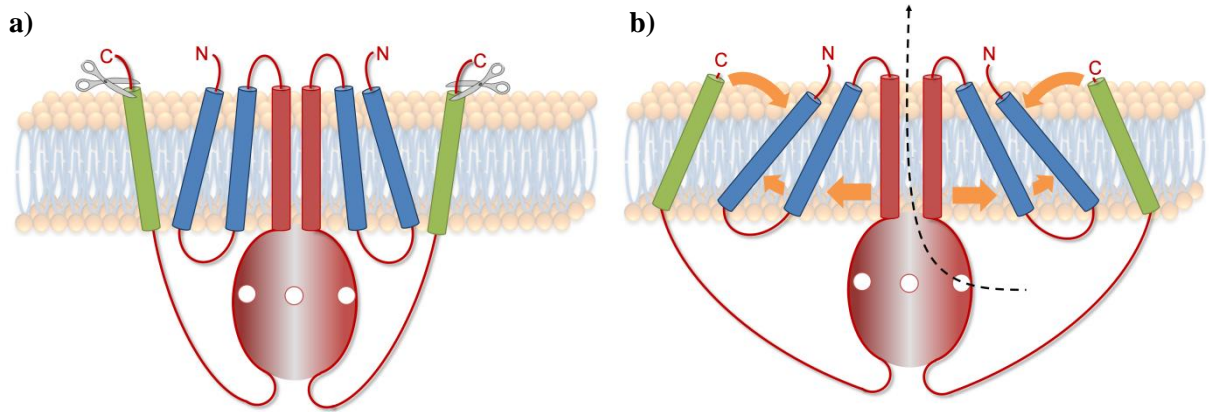


Abb. 51: Modell des Effekts einer Verkürzung um 110 Aminosäuren von MscCG. Ohne Modifikation der C-terminalen Domäne verbleibt der Kanal in einer energetisch vorteilhaften Konformation geschlossen (a). Eine Verkürzung dieser Domäne um 110 Aminosäuren führt zu einer drastischen Konformationsänderung der Kerndomäne. Der Efflux von Glutamat wird dabei durch eine Konformationsänderung der Pore vermittelt. TM1 und TM2 übermitteln dabei mechanische Kräfte an die porenformende dritte Transmembrandomäne, deren Konformationsänderung als Folge einer intramolekularen Interaktion oder passiv durch Änderungen von physikalischen Eigenschaften (Membrankrümmung, Änderung des Lateraldrucks und hydrophober *mismatch*) der umgebenden Lipiddoppelschicht zum Öffnen des Kanals führt (b). Die Verkürzung führt zu einer derart drastischen Konformationsänderung, dass die *gating*-Schwelle stark herabgesetzt wird oder ein Öffnen erzwungen wird.

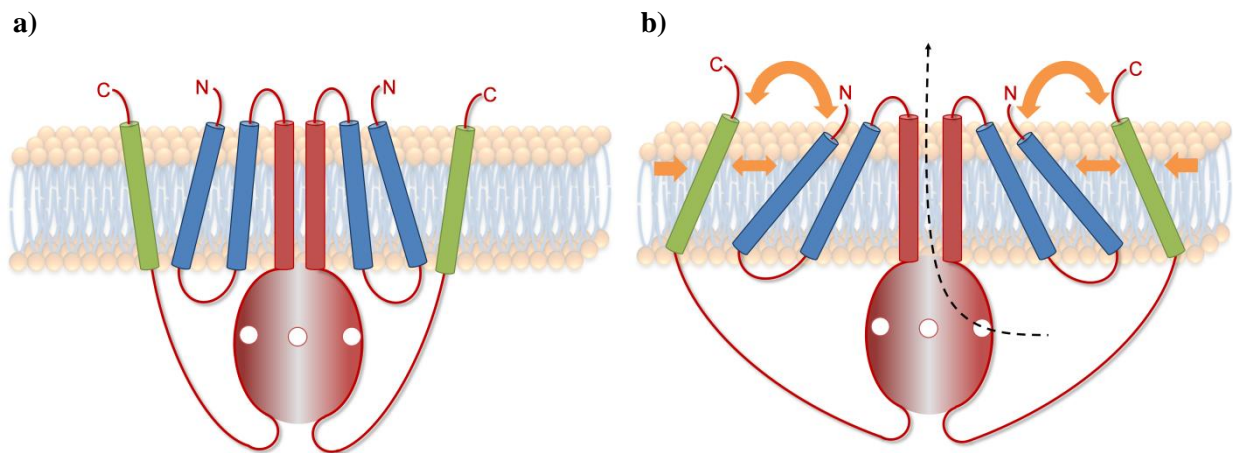


Abb. 52: Modell zur Regulation des *gating*-Verhaltens von MscCG. Ohne Modifikation der Lipiddoppelschicht verbleibt der Kanal in einer energetisch vorteilhaften Konformation geschlossen (a). Der Efflux von Glutamat wird durch Konformationsänderung der Kanalregion vermittelt. TM1 und TM2 übermitteln dabei mechanische Kräfte an die porenformende dritte Transmembrandomäne, deren Konformationsänderung durch Drehung zum Öffnen des Kanals führt (b). Für den Penicillin-vermittelten Efflux und damit der Wahrnehmung des mechanischen Reizes werden dabei ausschließlich TM1 bis TM3 benötigt. Die vierte Transmembrandomäne könnte die Inaktivierung des Kanals nach hypoosmotischem Schock vermitteln. Dabei interagiert die zusätzliche Domäne mit der Kanalregion durch Konformationsänderungen entweder aktiv als Folge einer intramolekularen Interaktion oder passiv durch Änderungen von physikalischen Eigenschaften (Membrankrümmung, Änderung des Lateraldrucks und hydrophober *mismatch*) der umgebenden Lipiddoppelschicht. Massive Überexpression und damit Clusterbildung könnten zur einer intermolekularen Modulation dieser Domäne und schließlich Konformationsänderung der Kanalregion zur Freisetzung von Glutamat führen. Die Lage der vierten Transmembrandomäne kann aufgrund fehlender Strukturdaten nur vermutet werden.

Die Funktion und Funktionsweise mechanosensitiver Kanäle ist äußerst komplex. So wird das Öffnungsverhalten von mechanosensitiven Kanälen durch viele Faktoren beeinflusst, die die Membranumgebung also auch die Struktur der Kanäle ändern und neben dem rein geschlossenen auch zu intermediären Zuständen wie zum Beispiel bei einer Inaktivierung führen. Die Identifikation und Charakterisierung immer neuer Mitglieder der MscS-Familie offenbart, dass diese neben den konservierten Kanaldomänen (TM1-3) auch einzigartige C- und N-terminale Domänen besitzen, die das *gating* durch Signaltransduktion, als Antwort auf Protein-Protein Interaktion oder Ligandenbindung, beeinflussen. So wurde für den mechanosensitiven Kanal bcNG (*cyclic nucleotide gated*) ein Homlog von MscS aus *E. coli* charakterisiert, das eine zusätzliche C-terminale Domäne besitzt, die die Mechanosensitivität des Kanals inhibiert und deren notwendige Bewegung für die Funktion des Kanals verhindert (Malcolm *et al.*, 2012). Außerdem wurde in *Corynebacterium diphtheriae* eine MscS-Unterfamilie identifiziert, die eine C-terminalen Glucose-Transporter-Domäne aufweist (Malcolm und Maurer, 2012). Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass die zusätzliche Domäne von MscCG zudem eine unbekannte Bindestelle für einen Regulator besitzt, der beispielsweise ein spontanes *gating*, ausgelöst durch die vierte Transmembrandomäne, verhindert. So könnte die Bindung eines konstitutiv exprimierten Repressorproteins eine Konformationsänderung und damit spontane Exkretion unterbinden und nur bei massiver Überexpression die Wahrscheinlichkeit einer Bindung des Repressors verringern, was zur Exkretion von Glutamat führen würde.

Es konnte gezeigt werden, dass MscCG neben seiner Funktion als Notventil zur Freisetzung kompatibler Solute nach hypoosmotischen Schock auch die spezifische Exkretion von Glutamat vermittelt. Für die Penicillin-ausgelöste Exkretion wird ausschließlich die Kanalregion mit drei Transmembrandomänen von MscCG benötigt, auf die Penicillin eine direkte Wirkung zu haben scheint. Modifikationen der zusätzlichen Domäne beeinflussen jedoch das *gating*-Verhalten nach hypoosmotischem Schock und damit die Feinabstimmung der Betainakkumulation und vermittelt unter massiver Expression die spontane Exkretion von Glutamat und verdeutlicht die regulatorische Rolle dieser Domäne. Aufgrund fehlender Strukturdaten bleibt eine genaue Aussage über den Mechanismus spekulativ. Zukünftige Untersuchungen zur Funktion von MscCG müssen die gezeigte regulatorische Bedeutung der einzigartigen C-terminalen Domäne für die duale Funktion des mechanosensitiven Kanals berücksichtigen.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden biochemische, als auch elektrophysiologische Untersuchungen zu der dualen Funktion des mechanosensitiven Kanals MscCG von *Corynebacterium glutamicum* durchgeführt. MscCG gehört zu der MscS-Familie von mechanosensitiven Kanälen, die eine essenzielle Rolle bei der hypoosmotischen Stressantwort von Bakterien einnehmen. Zur Vermeidung einer Zellyse als Folge unkontrollierten Einströmens von Wasser nach einem hypoosmotischen Schock, werden mechanosensitive Kanäle durch die erhöhte Membranspannung aktiviert und vermitteln die Freisetzung von Ionen und kompatiblen Soluten (Levina *et al.*, 1999). *C. glutamicum* zählt zu den wichtigsten Organismen in der industriellen Biotechnologie und ist Ziel intensiver Forschung der Produktionsoptimierung zur Herstellung von Aminosäuren und wird seit Jahrzehnten zur Herstellung von L-Glutamat eingesetzt, obgleich der Exportmechanismus lange Zeit unbekannt war. Vor wenigen Jahren wurde der mechanosensitive Kanal MscCG mit der Exkretion von Glutamat in Verbindung gebracht. Die C-terminale Verkürzung von MscCG um 110 Aminosäuren führte zu einer spontanen Exkretion von Glutamat, während die Deletion seines Gens die induzierte Exkretion drastisch verringerte (Nakamura *et al.*, 2007). MscCG besitzt zu neben seiner drei, zu MscS homologen Transmembrandomänen, eine zusätzliche C-terminale Domäne von 247 Aminosäuren, die eine vierte Transmembrandomäne beinhaltet und der C-terminus somit im Periplasma lokalisiert ist. Der Kanal besitzt typische Eigenschaften eines Membranspannungs-aktivierten Kanals und ist an der Freisetzung von kompatiblen Soluten wie Prolin und Glycin-Betain nach hypoosmotischem Schock beteiligt. Außerdem nimmt MscCG neben seiner Rolle als Notventil nach hypoosmotischem Schock auch eine Funktion bei der Feinabstimmung der internen Solutkonzentration bei Akkumulation von Betain im Zusammenspiel mit dem sekundär aktiven Transporter BetP unter hyperosmotischen Bedingungen ein. Die zusätzliche Domäne von MscCG ist nur in homologen Proteinen der Familie der *Corynebacteriaceae* zu finden und nimmt wahrscheinlich eine regulatorische Funktion bei der Exkretion von Glutamat als auch bei der hyperosmotischen Stressantwort ein. Auch die heterologe Expression von MscS erlaubte eine Induktion der Glutamatexkretion mit Penicillin in *C. glutamicum* und konnte durch die Fusion der zusätzlichen Domäne sogar erhöht werden (Börngen, 2009; Börngen *et al.*, 2010). Es war bisher jedoch nicht bekannt, ob die Exkretion direkt durch den Kanal vermittelt wird oder MscCG als möglicher Regulator für einen unbekanntes Exporter agiert. In dieser Arbeit konnte mit GOF- als auch

LOF-Mutationen gezeigt werden, dass Glutamat bei der Exkretion die Pore von MscCG passiert. So ermöglichten GOF-Mutationen eine spontane Exkretion, während LOF-Mutationen eine ausgelöste Exkretion auf das Ausmaß des Deletionsstamms verringerten. In elektrophysiologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass für eine mechanosensitive Aktivierung lediglich die ersten drei Transmembrandomänen benötigt werden. Auch haben Verkürzungen von bis zu 247 Aminosäuren keinen Einfluss auf die Penicillin-ausgelöste Exkretion von Glutamat und dessen Rate. Für eine spontane, wenn auch geringere Exkretion von Glutamat ist die Integrität der vierten Transmembrandomäne notwendig. Die spontane Glutamatexkretion bei massiver Überexpression wurde durch die Verkürzung der C-terminalen Domäne über die vierte Transmembrandomäne hinaus verhindert. Die Leitfähigkeit von MscCG war nach C-terminaler Verkürzung unverändert, was auf eine regulatorische Funktion der zusätzlichen Domäne schließen lässt. Die spontane Exkretion und der damit einhergehende Phänotyp, der nach Expression des um 110 AS verkürzten Kanals beobachtet wird, konnte durch Modifikation des hydrophoben C-terminalen Bereichs, der die vierte Transmembrandomäne bildet, verhindert werden. Eine Randomisierung eines konservierten Bereichs vor dieser hydrophoben Transmembrandomäne, verhinderte hingegen die spontane Exkretion von Glutamat. Detaillierte Mutationsanalysen von ungekürztem MscCG zeigten, dass nicht nur die Integrität der vorhergesagten vierten Transmembrandomäne, sondern auch konservierte Bereiche davor von Bedeutung sind.

Zusätzlich nimmt die C-terminale Domäne eine Funktion bei der Regulation der Betainakkumulation nach hypoosmotischem Schock ein. Bei Abwesenheit der vierten Transmembrandomäne wird die Akkumulation von Betain nach hypoosmotischem Schock durch massiven Efflux via MscCG verhindert.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine Exkretion von Glutamat direkt durch den mechanosensitiven Kanal MscCG vermittelt und von dessen C-terminalen Domäne beeinflusst wird. Neben ihrer regulatorischen Funktion zur Freisetzung von Glutamat nimmt die C-terminale Domäne außerdem eine maßgebliche Funktion bei der Feinabstimmung der Betainakkumulation unter hyperosmotischen Bedingungen ein. Die duale Funktion des mechanosensitiven Kanals durch Beteiligung an der hyper- als auch hypoosmotischen Stressantwort, sowie der Glutamatexkretion unterliegt demnach der regulatorischen Funktion der C-terminalen Domäne von MscCG.

6. Literaturverzeichnis

Abe, S., T. K. and K. S. (1967). "Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria." *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**: 279-301.

Akitake, B., A. Anishkin, N. Liu and S. Sukharev (2007). "Straightening and sequential buckling of the pore-lining helices define the gating cycle of MscS." *Nat Struct Mol Biol* **14**(12): 1141-1149.

Anishkin, A. and S. Sukharev (2009). "State-stabilizing Interactions in Bacterial Mechanosensitive Channel Gating and Adaptation." *Journal of Biological Chemistry* **284**(29): 19153-19157.

Arnold, K., L. Bordoli, J. Kopp and T. Schwede (2006). "The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling." *Bioinformatics* **22**(2): 195-201.

Asakura, Y., E. Kimura, Y. Usuda, Y. Kawahara, K. Matsui, T. Osumi and T. Nakamatsu (2007). "Altered Metabolic Flux due to Deletion of *odhA* causes l-Glutamate Overproduction in *Corynebacterium glutamicum*." *Applied and Environmental Microbiology* **73**(4): 1308-1319.

Balleza, D. and F. Gómez-Lagunas (2009). "Conserved motifs in mechanosensitive channels MscL and MscS." *Eur Biophys J* **38**(7): 1013-1027.

Barthe, P., C. Roumestand, M. J. Canova, L. Kremer, C. Hurard, V. Molle and M. Cohen-Gonsaud (2009). "Dynamic and Structural Characterization of a Bacterial FHA Protein Reveals a New Autoinhibition Mechanism." *Structure* **17**(4): 568-578.

Bass, R. B., P. Strop, M. Barclay and D. C. Rees (2002). "Crystal Structure of *Escherichia coli* MscS, a Voltage-Modulated and Mechanosensitive Channel." *Science* **298**(5598): 1582-1587.

Battle, A. R., E. Petrov, P. Pal and B. Martinac (2009). "Rapid and improved reconstitution of bacterial mechanosensitive ion channel proteins MscS and MscL into liposomes using a modified sucrose method." *FEBS Letters* **583**(2): 407-412.

Becker, J. and C. Wittmann (2012). "Systems and synthetic metabolic engineering for amino acid production – the heartbeat of industrial strain development." *Current Opinion in Biotechnology* **23**(5): 718-726.

Belanger, A. E., G. S. Besra, M. E. Ford, K. Mikusová, J. T. Belisle, P. J. Brennan and J. M. Inamine (1996). "The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**(21): 11919-11924.

Belyy, V., A. Anishkin, K. Kamaraju, N. Liu and S. Sukharev (2010). "The tension-transmitting 'clutch' in the mechanosensitive channel MscS." *Nat Struct Mol Biol* **17**(4): 451-458.

Berrier, C., M. Besnard, B. Ajouz, A. Coulombe and A. Ghazi (1996). "Multiple Mechanosensitive Ion Channels from *Escherichia coli*, Activated at Different Thresholds of Applied Pressure." *J. Membrane Biol.* **151**(2): 175-187.

Blount, P. and P. C. Moe (1999). "Bacterial mechanosensitive channels: integrating physiology, structure and function." *Trends in Microbiology* **7**(10): 420-424.

Blount, P., S. I. Sukharev, M. J. Schroeder, S. K. Nagle and C. Kung (1996). "Single residue substitutions that change the gating properties of a mechanosensitive channel in *Escherichia coli*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**(21): 11652-11657.

Boer, M., A. Anishkin and S. Sukharev (2011). "Adaptive MscS Gating in the Osmotic Permeability Response in *E. coli*: The Question of Time." *Biochemistry* **50**(19): 4087-4096.

Booth, I. R. and P. Blount (2012). "The MscS and MscL Families of Mechanosensitive Channels Act as Microbial Emergency Release Valves." *Journal of Bacteriology* **194**(18): 4802-4809.

Börngen, K. (2009). "YggB of *Corynebacterium glutamicum* - Dual function in osmotic stress response and glutamate production." *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität zu Köln Dissertation*.

Börngen, K., A. R. Battle, N. Möker, S. Morbach, K. Marin, B. Martinac and R. Krämer (2010). "The properties and contribution of the *Corynebacterium glutamicum* MscS variant to fine-tuning of osmotic adaptation." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1798**(11): 2141-2149.

Botzenhardt, J., S. Morbach and R. Krämer (2004). "Activity regulation of the betaine transporter BetP of *Corynebacterium glutamicum* in response to osmotic compensation." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1667**(2): 229-240.

Boulahya, K.-A., E. Guedon, S. Delaunay, C. Schultz, J. Boudrant, M. Bott and J.-L. Goergen (2010). "OdhI dephosphorylation kinetics during different glutamate production

processes involving *Corynebacterium glutamicum*." *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**(5): 1867-1874.

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.

Brocker, M. and M. Bott (2006). "Evidence for activator and repressor functions of the response regulator MtrA from *Corynebacterium glutamicum*." *FEMS Microbiology Letters* **264**(2): 205-212.

Burkovski, A. (2013). "Cell Envelope of *Corynebacteria*: Structure and Influence on Pathogenicity." *ISRN Microbiology* **2013**: 11.

Caldwell, D. B., H. R. Malcolm, D. E. Elmore and J. A. Maurer (2010). "Identification and experimental verification of a novel family of bacterial cyclic nucleotide-gated (bCNG) ion channels." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1798**(9): 1750-1756.

Cantor, R. S. (1997). "The Lateral Pressure Profile in Membranes: A Physical Mechanism of General Anesthesia." *Biochemistry* **36**(9): 2339-2344.

Chang, G., R. H. Spencer, A. T. Lee, M. T. Barclay and D. C. Rees (1998). "Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: a gated mechanosensitive ion channel." *Science* **282**(5397): 2220-2226.

Criado, M. and B. U. Keller (1987). "A membrane fusion strategy for single-channel recordings of membranes usually non-accessible to patch-clamp pipette electrodes." *FEBS Letters* **224**(1): 172-176.

Csonka, L. N. and W. Epstein (1996). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Cellular and Molecular Biology, European Molecular Biology Organization: 1210-1224.

Delcour, A. H., B. Martinac, J. Adler and C. Kung (1989). "Modified reconstitution method used in patch-clamp studies of *Escherichia coli* ion channels." *Biophysical Journal* **56**(3): 631-636.

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

Ebbighausen, H., B. Weil and R. Kramer (1991). "Na(+)-dependent succinate uptake in *Corynebacterium glutamicum*." *FEMS Microbiol Lett* **61**(1): 61-65.

Edwards, M. D., W. Bartlett and I. R. Booth (2008). "Pore Mutations of the *Escherichia coli* MscS Channel Affect Desensitization but Not Ionic Preference." *Biophysical Journal* **94**(8): 3003-3013.

Edwards, M. D., I. R. Booth and S. Miller (2004). "Gating the bacterial mechanosensitive channels: MscS a new paradigm?" *Current Opinion in Microbiology* **7**(2): 163-167.

Edwards, M. D., Y. Li, S. Kim, S. Miller, W. Bartlett, S. Black, S. Dennison, I. Iscla, P. Blount, J. U. Bowie and I. R. Booth (2005). "Pivotal role of the glycine-rich TM3 helix in gating the MscS mechanosensitive channel." *Nat Struct Mol Biol* **12**(2): 113-119.

Eggeling, L. and H. Sahn (2001). "The cell wall barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux." *Journal of Bioscience and Bioengineering* **92**(3): 201-213.

Eikmanns, B. J., E. Kleinertz, W. Liebl and H. Sahn (1991). "A family of *Corynebacterium glutamicum/Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing." *Gene* **102**(1): 93-98.

Epstein, W. (1986). "Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*." *FEMS Microbiology Letters* **39**(1-2): 73-78.

Eswar, N., B. Webb, M. A. Marti-Renom, M. S. Madhusudhan, D. Eramian, M.-y. Shen, U. Pieper and A. Sali (2001). *Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER*. Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, Inc.

Farwick, M., R. M. Siewe and R. Kramer (1995). "Glycine betaine uptake after hyperosmotic shift in *Corynebacterium glutamicum*." *J Bacteriol* **177**(16): 4690-4695.

Frings, E., H. J. Kunte and E. A. Galinski (1993). "Compatible solutes in representatives of the genera *Brevibacterium* and *Corynebacterium*: Occurrence of tetrahydropyrimidines and glutamine." *FEMS Microbiology Letters* **109**(1): 25-32.

Gamini, R., M. Sotomayor, C. Chipot and K. Schulten (2011). "Cytoplasmic Domain Filter Function in the Mechanosensitive Channel of Small Conductance." *Biophysical Journal* **101**(1): 80-89.

Gande, R., L. G. Dover, K. Krumbach, G. S. Besra, H. Sahn, T. Oikawa and L. Eggeling (2007). "The Two Carboxylases of *Corynebacterium glutamicum* Essential for Fatty Acid and Mycolic Acid Synthesis." *Journal of Bacteriology* **189**(14): 5257-5264.

Gebhardt, H., X. Meniche, M. Tropis, R. Krämer, M. Daffé and S. Morbach (2007). "The key role of the mycolic acid content in the functionality of the cell wall permeability barrier in *Corynebacterineae*." *Microbiology* **153**(5): 1424-1434.

Grammann, K., A. Volke and H. J. Kunte (2002). "New Type of Osmoregulated Solute Transporter Identified in Halophilic Members of the Bacteria Domain: TRAP Transporter TeaABC Mediates Uptake of Ectoine and Hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581T." *Journal of Bacteriology* **184**(11): 3078-3085.

Grant, S. G., J. Jessee, F. R. Bloom and D. Hanahan (1990). "Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**(12): 4645-4649.

Guillouet, S. and J. M. Engasser (1995a). "Growth of *Corynebacterium glutamicum* in glucose-limited continuous cultures under high osmotic pressure. Influence of growth rate on the intracellular accumulation of proline, glutamate and trehalose." *Applied Microbiology and Biotechnology* **44**(3-4): 496-500.

Guillouet, S. and J. M. Engasser (1995b). "Sodium and proline accumulation in *Corynebacterium glutamicum* as a response to an osmotic saline upshock." *Applied Microbiology and Biotechnology* **43**(2): 315-320.

Gutmann, M., C. Hoischen and R. Krämer (1992). "Carrier-mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1112**(1): 115-123.

Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann and F. J. Sigworth (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." *Pflugers Arch* **391**(2): 85-100.

Häse, C. C., A. C. Le Dain and B. Martinac (1995). "Purification and Functional Reconstitution of the Recombinant Large Mechanosensitive Ion Channel (MscL) of *Escherichia coli*." *Journal of Biological Chemistry* **270**(31): 18329-18334.

Hirasawa, T., J. Kim, T. Shirai, C. Furusawa and H. Shimizu (2012). "Molecular Mechanisms and Metabolic Engineering of Glutamate Overproduction in *Corynebacterium glutamicum*." *Subcell Biochem* **64**: 261-281.

Hoischen, C. and R. Krämer (1989). "Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum*." *Arch. Microbiol.* **151**(4): 342-347.

Hoischen, C. and R. Krämer (1990). "Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*." *Journal of Bacteriology* **172**(6): 3409-3416.

Horton, R. M., H. D. Hunt, S. N. Ho, J. K. Pullen and L. R. Pease (1989). "Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension." *Gene* **77**(1): 61-68.

Hutchison, C. A., S. Phillips, M. H. Edgell, S. Gillam, P. Jahnke and M. Smith (1978). "Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence." *Journal of Biological Chemistry* **253**(18): 6551-6560.

Ikeda, M. and S. Nakagawa (2003). "The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes." *Appl Microbiol Biotechnol* **62**(2-3): 99-109.

Island, M. D. and R. J. Kadner (1993). "Interplay between the membrane-associated UhpB and UhpC regulatory proteins." *Journal of Bacteriology* **175**(16): 5028-5034.

Jarlier, V. and H. Nikaido (1990). "Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*." *Journal of Bacteriology* **172**(3): 1418-1423.

Jarlier, V. and H. Nikaido (1994). "Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics." *FEMS Microbiol Lett* **123**(1-2): 11-18.

Kalinowski, J., B. Bathe, D. Bartels, N. Bischoff, M. Bott, A. Burkovski, N. Dusch, L. Eggeling, B. J. Eikmanns, L. Gaigalat, A. Goesmann, M. Hartmann, K. Huthmacher, R. Krämer, B. Linke, A. C. McHardy, F. Meyer, B. Möckel, W. Pfefferle, A. Pühler, D. A. Rey, C. Rückert, O. Rupp, H. Sahl, V. F. Wendisch, I. Wiegräbe and A. Tauch (2003). "The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of l-aspartate-derived amino acids and vitamins." *Journal of Biotechnology* **104**(1-3): 5-25.

Kashket, E. R. (1985). "The Proton Motive Force in Bacteria: A Critical Assessment of Methods." *Annual Review of Microbiology* **39**(1): 219-242.

Kawahara, Y., T. Ohsumi, Y. Yoshihara and S. Ikeda (1989). "Proline in the Osmoregulation of *Brevibacterium lactofermentum*." *Agricultural and Biological Chemistry* **53**(9): 2475-2479.

Kawahara, Y., K. Takahashi-Fuke, E. Shimizu, T. Nakamatsu and S. Nakamori (1997). "Relationship between the Glutamate Production and the Activity of 2-Oxoglutarate Dehydrogenase in *Brevibacterium lactofermentum*." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **61**(7): 1109-1112.

Killian, J. A. (1998). "Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1376**(3): 401-416.

Kim, J., T. Hirasawa, M. Saito, C. Furusawa and H. Shimizu (2011). "Investigation of phosphorylation status of OdhI protein during penicillin- and Tween 40-triggered glutamate overproduction by *Corynebacterium glutamicum*." *Applied Microbiology and Biotechnology* **91**(1): 143-151.

Kimura, E. (2002). "Triggering Mechanism of Glutamate Overproduction by DtsR1 in Coryneform Bacteria." *Journal of Bioscience and Bioengineering* **94**(6): 545-551.

Kimura, E. (2005). *L-Glutamate Production*, RC Press, Boca Raton.

Kimura, E., C. Abe, Y. Kawahara and T. Nakamatsu (1996). "Molecular Cloning of a Novel Gene, *dtsR*, Which Rescues the Detergent Sensitivity of a Mutant Derived from *Brevibacterium lactofermentum*." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **60**(10): 1565-1570.

Kimura, E., C. Abe, Y. Kawahara, T. Nakamatsu and H. Tokuda (1997). "AdtsR Gene-Disrupted Mutant of *Brevibacterium lactofermentum* Requires Fatty Acids for Growth and Efficiently Produces L-Glutamate in the Presence of an Excess of Biotin." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **234**(1): 157-161.

Kimura, E., C. Yagoshi, Y. Kawahara, T. Ohsumi, T. Nakamatsu and H. Tokuda (1999). "Glutamate Overproduction in *Corynebacterium glutamicum* Triggered by a Decrease in the Level of a Complex Comprising DtsR and a Biotin-containing Subunit." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **63**(7): 1274-1278.

Kinoshita, S., S. Udaka and M. Shimono (1957). "STUDIES ON THE AMINO ACID FERMENTATION

PART I. PRODUCTION OF L-GLUTAMIC ACID BY VARIOUS MICROORGANISMS." *The Journal of General and Applied Microbiology* **3**(3): 193-205.

Kočan, M., S. Schaffer, T. Ishige, U. Sorger-Herrmann, V. F. Wendisch and M. Bott (2006). "Two-Component Systems of *Corynebacterium glutamicum*: Deletion Analysis and Involvement of the PhoS-PhoR System in the Phosphate Starvation Response." *Journal of Bacteriology* **188**(2): 724-732.

Koch, A. L. (1984). "Shrinkage of growing *Escherichia coli* cells by osmotic challenge." *Journal of Bacteriology* **159**(3): 919-924.

Koprowski, P., W. Grajkowski, E. Y. Isacoff and A. Kubalski (2011). "Genetic Screen for Potassium Leaky Small Mechanosensitive Channels (MscS) in *Escherichia coli*: RECOGNITION OF CYTOPLASMIC β DOMAIN AS A NEW GATING ELEMENT." *Journal of Biological Chemistry* **286**(1): 877-888.

Krawczyk, S., K. Raasch, C. Schultz, M. Hoffelder, L. Eggeling and M. Bott (2010). "The FHA domain of OdhI interacts with the carboxyterminal 2-oxoglutarate dehydrogenase domain of OdhA in *Corynebacterium glutamicum*." FEBS Letters **584**(8): 1463-1468.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

Lambert, C., A. Erdmann, M. Eikmanns and R. Kramer (1995). "Triggering Glutamate Excretion in *Corynebacterium glutamicum* by Modulating the Membrane State with Local Anesthetics and Osmotic Gradients." Applied and Environmental Microbiology **61**(12): 4334-4342.

Landfald, B. and A. R. Strøm (1986). "Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*." Journal of Bacteriology **165**(3): 849-855.

Lee, A. G. (1998). "How lipids interact with an intrinsic membrane protein: the case of the calcium pump." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes **1376**(3): 381-390.

Leuchtenberger, W., K. Huthmacher and K. Drauz (2005). "Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects." Applied Microbiology and Biotechnology **69**(1): 1-8.

Levina, N., S. Totemeyer, N. R. Stokes, P. Louis, M. A. Jones and I. R. Booth (1999). "Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity." EMBO J **18**(7): 1730-1737.

Lindén, M., P. Sens and R. Phillips (2012). "Entropic Tension in Crowded Membranes." PLoS Comput Biol **8**(3): e1002431.

Liu, Z., C. S. Gandhi and D. C. Rees (2009). "Structure of a tetrameric MscL in an expanded intermediate state." Nature **461**(7260): 120-124.

Malcolm, H. R., D. E. Elmore and J. A. Maurer (2012). "Mechanosensitive behavior of bacterial cyclic nucleotide gated (bCNG) ion channels: Insights into the mechanism of channel gating in the mechanosensitive channel of small conductance superfamily." Biochemical and Biophysical Research Communications **417**(3): 972-976.

Malcolm, H. R. and J. A. Maurer (2012). "The Mechanosensitive Channel of Small Conductance (MscS) Superfamily: Not Just Mechanosensitive Channels Anymore." ChemBioChem **13**(14): 2037-2043.

Martinac, B., J. Adler and C. Kung (1990). "Mechanosensitive ion channels of *E. coli* activated by amphipaths." *Nature* **348**(6298): 261-263.

Martinac, B., M. Buechner, A. H. Delcour, J. Adler and C. Kung (1987). "Pressure-sensitive ion channel in *Escherichia coli*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**(8): 2297-2301.

Miller, S., W. Bartlett, S. Chandrasekaran, S. Simpson, M. Edwards and I. R. Booth (2003a). "Domain organization of the MscS mechanosensitive channel of *Escherichia coli*." *EMBO J* **22**(1): 36-46.

Miller, S., M. D. Edwards, C. Ozdemir and I. R. Booth (2003b). "The Closed Structure of the MscS Mechanosensitive Channel." *Journal of Biological Chemistry* **278**(34): 32246-32250.

Möker, N., M. Brocker, S. Schaffer, R. Krämer, S. Morbach and M. Bott (2004). "Deletion of the genes encoding the MtrA–MtrB two-component system of *Corynebacterium glutamicum* has a strong influence on cell morphology, antibiotics susceptibility and expression of genes involved in osmoprotection." *Molecular Microbiology* **54**(2): 420-438.

Morbach, S. and R. Krämer (2003). "Impact of transport processes in the osmotic response of *Corynebacterium glutamicum*." *Journal of Biotechnology* **104**(1–3): 69-75.

Morbach, S. K., R. (2005). *Osmoregulation.* , RC Press, Boca Raton.

Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51**: 263-273.

Naismith, J. H. and I. R. Booth (2012). "Bacterial mechanosensitive channels--MscS: evolution's solution to creating sensitivity in function." *Annu Rev Biophys* **41**: 157-177.

Nakamaru, Y., Y. Takahashi, T. Unemoto and T. Nakamura (1999). "Mechanosensitive channel functions to alleviate the cell lysis of marine bacterium, *Vibrio alginolyticus*, by osmotic downshock." *FEBS Letters* **444**(2–3): 170-172.

Nakamura, J., S. Hirano, H. Ito and M. Wachi (2007). "Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 Gene, Encoding a Mechanosensitive Channel Homolog, Induce L-Glutamic Acid Production." *Appl. Environ. Microbiol.* **73**(14): 4491-4498.

Nampoothiri, K. M., C. Hoischen, B. Bathe, B. Mockel, W. Pfefferle, K. Krumbach, H. Sahm and L. Eggeling (2002). "Expression of genes of lipid synthesis and altered lipid composition modulates L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum*." Appl Microbiol Biotechnol **58**(1): 89-96.

Nara, T., H. Samejima and S. Kinoshita (1964). "Effect of Penicillin on Amino Acid Fermentation." Agricultural and Biological Chemistry **28**(2): 120-124.

Niebisch, A., A. Kabus, C. Schultz, B. Weil and M. Bott (2006). "Corynebacterial Protein Kinase G Controls 2-Oxoglutarate Dehydrogenase Activity via the Phosphorylation Status of the OdhI Protein." Journal of Biological Chemistry **281**(18): 12300-12307.

Nomura, T., C. G. Cranfield, E. Deplazes, D. M. Owen, A. Macmillan, A. R. Battle, M. Constantine, M. Sokabe and B. Martinac (2012). "Differential effects of lipids and lysolipids on the mechanosensitivity of the mechanosensitive channels MscL and MscS." Proceedings of the National Academy of Sciences.

Nomura, T., M. Sokabe and K. Yoshimura (2006). "Lipid-Protein Interaction of the MscS Mechanosensitive Channel Examined by Scanning Mutagenesis." Biophysical Journal **91**(8): 2874-2881.

Nomura, T., M. Sokabe and K. Yoshimura (2008). "Interaction between the Cytoplasmic and Transmembrane Domains of the Mechanosensitive Channel MscS." Biophysical Journal **94**(5): 1638-1645.

Notredame, C., D. G. Higgins and J. Heringa (2000). "T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment." Journal of Molecular Biology **302**(1): 205-217.

Nottebrock, D., U. Meyer, R. Krämer and S. Morbach (2003). "Molecular and biochemical characterization of mechanosensitive channels in *Corynebacterium glutamicum*." FEMS Microbiology Letters **218**(2): 305-309.

Nunheimer, T. D., J. Birnbaum, E. D. Ihnen and A. L. Demain (1970). "Product inhibition of the fermentative formation of glutamic acid." Appl Microbiol **20**(2): 215-217.

Okada, K., P. C. Moe and P. Blount (2002). "Functional Design of Bacterial Mechanosensitive Channels: COMPARISONS AND CONTRASTS ILLUMINATED BY RANDOM MUTAGENESIS." Journal of Biological Chemistry **277**(31): 27682-27688.

Oliet, S. H. R. and C. W. Bourque (1996). "Gadolinium Uncouples Mechanical Detection and Osmoreceptor Potential in Supraoptic Neurons." Neuron **16**(1): 175-181.

Ott, V., J. Koch, K. Späte, S. Morbach and R. Krämer (2008). "Regulatory Properties and Interaction of the C- and N-Terminal Domains of BetP, an Osmoregulated Betaine Transporter from *Corynebacterium glutamicum*." *Biochemistry* **47**(46): 12208-12218.

Özcan, N., C. S. Ejsing, A. Shevchenko, A. Lipski, S. Morbach and R. Krämer (2007). "Osmolality, Temperature, and Membrane Lipid Composition Modulate the Activity of Betaine Transporter BetP in *Corynebacterium glutamicum*." *Journal of Bacteriology* **189**(20): 7485-7496.

Perozo, E., A. Kloda, D. M. Cortes and B. Martinac (2002). "Physical principles underlying the transduction of bilayer deformation forces during mechanosensitive channel gating." *Nat Struct Mol Biol* **9**(9): 696-703.

Peter, H., A. Bader, A. Burkovski, C. Lambert and R. Krämer (1997). "Isolation of the putP gene of *Corynebacterium glutamicum* and characterization of a low-affinity uptake system for compatible solutes." *Arch. Microbiol.* **168**(2): 143-151.

Peter, H., A. Burkovski and R. Krämer (1996). "Isolation, characterization, and expression of the *Corynebacterium glutamicum* betP gene, encoding the transport system for the compatible solute glycine betaine." *Journal of Bacteriology* **178**(17): 5229-5234.

Peter, H., B. Weil, A. Burkovski, R. Kramer and S. Morbach (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**(22): 6005-6012.

Petrov, E., D. Palanivelu, M. Constantine, Paul R. Rohde, Charles D. Cox, T. Nomura, Daniel L. Minor Jr and B. Martinac (2013). "Patch-Clamp Characterization of the MscS-like Mechanosensitive Channel from *Silicibacter pomeroyi*." *Biophysical Journal* **104**(7): 1426-1434.

Pliotas, C., R. Ward, E. Branigan, A. Rasmussen, G. Hagelueken, H. Huang, S. S. Black, I. R. Booth, O. Schiemann and J. H. Naismith (2012). "Conformational state of the MscS mechanosensitive channel in solution revealed by pulsed electron-electron double resonance (PELDOR) spectroscopy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(40): E2675-2682.

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

Puech, V., M. Chami, A. Lemassu, M.-A. Lanéelle, B. Schiffler, P. Gounon, N. Bayan, R. Benz and M. Daffé (2001). "Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane." *Microbiology* **147**(5): 1365-1382.

Radmacher, E., K. C. Stansen, G. S. Besra, L. J. Alderwick, W. N. Maughan, G. Hollweg, H. Sahm, V. F. Wendisch and L. Eggeling (2005). "Ethambutol, a cell wall inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis*, elicits L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum*." *Microbiology* **151**(5): 1359-1368.

Ressl, S., A. C. Terwisscha van Scheltinga, C. Vorrhein, V. Ott and C. Ziegler (2009). "Molecular basis of transport and regulation in the Na⁺/betaine symporter BetP." *Nature* **458**(7234): 47-52.

Romantsov, T., Z. Guan and J. M. Wood (2009). "Cardiolipin and the osmotic stress responses of bacteria." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1788**(10): 2092-2100.

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

Rubenhagen, R., S. Morbach and R. Kramer (2001). "The osmoreactive betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* is a sensor for cytoplasmic K⁺." *EMBO J* **20**(19): 5412-5420.

Rübenhagen, R., H. Rönsch, H. Jung, R. Krämer and S. Morbach (2000). "Osmosensor and Osmoregulator Properties of the Betaine Carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in Proteoliposomes." *Journal of Biological Chemistry* **275**(2): 735-741.

Ruffert, S., C. Berrier, R. Krämer and A. Ghazi (1999). "Identification of Mechanosensitive Ion Channels in the Cytoplasmic Membrane of *Corynebacterium glutamicum*." *Journal of Bacteriology* **181**(5): 1673-1676.

Ruffert, S., C. Lambert, H. Peter, V. F. Wendisch and R. Krämer (1997). "Efflux of Compatible Solutes in *Corynebacterium Glutamicum* Mediated by Osmoregulated Channel Activity." *European Journal of Biochemistry* **247**(2): 572-580.

Ruthe, H.-J. and J. Adler (1985). "Fusion of bacterial spheroplasts by electric fields." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **819**(1): 105-113.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schiller, D., R. Krämer and S. Morbach (2004a). "Cation specificity of osmosensing by the betaine carrier BetP of *Corynebacterium glutamicum*." *FEBS Letters* **563**(1-3): 108-112.

Schiller, D., V. Ott, R. Krämer and S. Morbach (2006). "Influence of Membrane Composition on Osmosensing by the Betaine Carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum*." *Journal of Biological Chemistry* **281**(12): 7737-7746.

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

Schultz, C., A. Niebisch, L. Gebel and M. Bott (2007). "Glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*: dependence on the oxoglutarate dehydrogenase inhibitor protein OdhI and protein kinase PknG." *Applied Microbiology and Biotechnology* **76**(3): 691-700.

Schultz, C., A. Niebisch, A. Schwaiger, U. Viets, S. Metzger, M. Bramkamp and M. Bott (2009). "Genetic and biochemical analysis of the serine/threonine protein kinases PknA, PknB, PknG and PknL of *Corynebacterium glutamicum*: evidence for non-essentiality and for phosphorylation of OdhI and FtsZ by multiple kinases." *Molecular Microbiology* **74**(3): 724-741.

Schumann, U., M. D. Edwards, C. Li and I. R. Booth (2004). "The conserved carboxy-terminus of the MscS mechanosensitive channel is not essential but increases stability and activity." *FEBS Letters* **572**(1-3): 233-237.

Schumann, U., M. D. Edwards, T. Rasmussen, W. Bartlett, P. van West and I. R. Booth (2010). "YbdG in *Escherichia coli* is a threshold-setting mechanosensitive channel with MscM activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**(28): 12664-12669.

Seidel, M., L. J. Alderwick, H. Sahn, G. S. Besra and L. Eggeling (2007). "Topology and mutational analysis of the single Emb arabinofuranosyltransferase of *Corynebacterium glutamicum* as a model of Emb proteins of *Mycobacterium tuberculosis*." *Glycobiology* **17**(2): 210-219.

Shiio, I., S.-I. ÔTSUKA and M. TAKAHASHI (1962). "Effect of Biotin on the Bacterial Formation of Glutamic Acid: I. Glutamate Formation and Cellular Permeability of Amino Acids." *Journal of Biochemistry* **51**(1): 56-62.

Skjerdal, O. T., H. Sletta, S. G. Flenstad, K. D. Josefsen, D. W. Levine and T. E. Ellingsen (1996). "Changes in intracellular composition in response to hyperosmotic stress of NaCl, sucrose or glutamic acid in *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*." *Applied Microbiology and Biotechnology* **44**(5): 635-642.

Sotomayor, M. and K. Schulten (2004). "Molecular Dynamics Study of Gating in the Mechanosensitive Channel of Small Conductance MscS." *Biophysical Journal* **87**(5): 3050-3065.

Sotomayor, M., V. Vásquez, E. Perozo and K. Schulten (2007). "Ion Conduction through MscS as Determined by Electrophysiology and Simulation." *Biophysical Journal* **92**(3): 886-902.

Stackebrandt, E., F. A. Rainey and N. L. Ward-Rainey (1997). "Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actinobacteria classis nov." *Int J Syst Bacteriol* **47**(2): 479-491.

Steger, R., M. Weinand, R. Krämer and S. Morbach (2004). "LcoP, an osmoregulated betaine/ectoine uptake system from *Corynebacterium glutamicum*." *FEBS Letters* **573**(1-3): 155-160.

Sukharev, S. (2002). "Purification of the Small Mechanosensitive Channel of *Escherichia coli* (MscS): the Subunit Structure, Conduction, and Gating Characteristics in Liposomes." *Biophysical Journal* **83**(1): 290-298.

Sukharev, S. I., P. Blount, B. Martinac, F. R. Blattner and C. Kung (1994). "A large-conductance mechanosensitive channel in *E. coli* encoded by *mscL* alone." *Nature* **368**(6468): 265-268.

Takinami, K., H. Okada and T. Tsunoda (1964). "Biochemical Effects of Fatty Acid and its Derivatives on L-Glutamic Acid Fermentation

Part II. Effective Chemical Structure of Fatty Acid derivatives on the Accumulation of L-Glutamic Acid in Biotin Sufficient Medium." *Agricultural and Biological Chemistry* **28**(2): 114-119.

Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9): 4350-4354.

Tropis, M., X. Meniche, A. Wolf, H. Gebhardt, S. Strelkov, M. Chami, D. Schomburg, R. Krämer, S. Morbach and M. Daffé (2005). "The Crucial Role of Trehalose and Structurally Related Oligosaccharides in the Biosynthesis and Transfer of Mycolic Acids in *Corynebacterineae*." *Journal of Biological Chemistry* **280**(28): 26573-26585.

Ursell, T., A. Agrawal and R. Phillips (2011). "Lipid Bilayer Mechanics in a Pipette with Glass-Bilayer Adhesion." *Biophysical Journal* **101**(8): 1913-1920.

Vandeyar, M. A., M. P. Weiner, C. J. Hutton and C. A. Batt (1988). "A simple and rapid method for the selection of oligodeoxynucleotide-directed mutants." *Gene* **65**(1): 129-133.

Vásquez, V. (2013). "MscS Inactivation: an Exception rather than the Rule. An Extremophilic MscS Reveals Diversity within the Family." *Biophysical Journal* **104**(7): 1391-1393.

Vertès, A. A., M. Inui and H. Yukawa (2012). "Postgenomic Approaches to Using *Corynebacteria* as Biocatalysts." *Annual Review of Microbiology* **66**(1): 521-550.

Vora, T., B. Corry and S.-H. Chung (2006). "Brownian dynamics investigation into the conductance state of the MscS channel crystal structure." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1758**(6): 730-737.

Wang, W., S. S. Black, M. D. Edwards, S. Miller, E. L. Morrison, W. Bartlett, C. Dong, J. H. Naismith and I. R. Booth (2008). "The Structure of an Open Form of an *E. coli* Mechanosensitive Channel at 3.45 Å... Resolution." *Science* **321**(5893): 1179-1183.

Wiggins, P. and R. Phillips (2005). "Membrane-Protein Interactions in Mechanosensitive Channels." *Biophysical Journal* **88**(2): 880-902.

Wolf, A., R. Krämer and S. Morbach (2003). "Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and their significance in response to osmotic stress." *Molecular Microbiology* **49**(4): 1119-1134.

Wood, J. M. (1999). "Osmosensing by Bacteria: Signals and Membrane-Based Sensors." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**(1): 230-262.

Yon, J. and M. Fried (1989). "Precise gene fusion by PCR." *Nucleic Acids Research* **17**(12): 4895.

Yoo, J. and Q. Cui (2009). "Curvature Generation and Pressure Profile Modulation in Membrane by Lysolipids: Insights from Coarse-Grained Simulations." *Biophysical Journal* **97**(8): 2267-2276.

Anhang

Fus_Insert_C_Fw	ccgattccgaagcacgcgtggcaaagcgcc
Fus_Insert_C_Re	gtgcttcggaatcggactgg
Fus_rand_rev	gtcatgaccttaaatagtgac
Fus_rand_for	gtcactatttaagggtcatgac
pEKEx2_fw	cggctcgtataatgtgtgg
pEKEx2_rv	caggctgaaaatcttctctc

Tab. 20b: Verwendete Oligonukleotide für die Ortsgerichtete Mutagenese

Name	Sequenz 5' – 3'
mscCG_A106V_s	caccaaggccaatcacagctgacgcaatgg
mscCG_A106V_as	ccattgcgtcagctgtgattggccttgggtg
mscCG_L109S_s	tcgactgcgaccggagccaatggcagctg
mscCG_L109_as	cagctgccattggctccggtgcgagtcga
mscCG_A103P_s	caatggcagctgatggaatggttgccggaa
mscCG_A103P_as	ttccggcaaccattccatcagctgccattg
mscCG_A103P_s2	caatggcagctgatggaatggttgccggaatcgcagc
mscCG_A103P_as2	gctgcgattccggcaaccattccatcagctgccattg
mscCG_L109S_s_2	caatcgactgcgaccggagccaatggcagctgacg
mscCG_L109S_as_2	cgtcagctgccattggctccggtgcgagtcgattg
A51D_sense	gtggagtctgcagacgatgcggacacc
A51D_antisense	gggtgtccgcatcgtctgcagactccac
V70D_sense	cgcggcgcttggcgattatatcgcg
V70D_antisense	gcgcgatataatcgccaacgcggcg
M86D_sense	gcttgccgtctccgcggaccaggcttttggtttctc
M86D_antisense	gagaaacaaaagcctgggtccgcggagacggcaagc
L41D_sense	ccacgtatcggccgagacgccatgcgtattatcaag
L41D_antisense	cttgataatacgcgatggcgtctcggccgatacgtgg
L31N_sense	gatgtagcaattatcctgggtcaacgcgtttttgattccacgtatcg
L31N_antisense	cgatacgtggaatcaaaaacgcgttgaccaggataattgctacatc
L93N_sense	gcaggcttttggtttctctaacgcgggctg
L93N_antisense	cagcgcccgcgttagagaaacaaaagcctgc
F78N_sense	cgcgcaaattgtggcgaacttcatgcttgccgtctccg

Anhang

F78N_antisense	cggagacggcaagcatgaagttcgccacaatTTGCGCG
I45N_sense	cgactggccatgcgtaacatcaagcgccgagtg
I45N_antisense	cactcggcgcttgatgttacgcatggccagtcg
I46N_sense	cgactggccatgcgtattaacaagcgccgag
I461N_antisense	ctcggcgcttgTTAatacgcgatggccagtcg
A51N_sense	ccgagtggagtctgcaaacgatgcggacacc
A51N_antisense	ggTgtccgcacTcgtttgcagactccactcgg
V70N_sense	gcgttcgccggcgTTggcaactatatcgcgc
V70N_antisense	gcgcgatatagttgccaacgccggcggaacgc
M86N_sense	cttgccgtctccgcgaaccaggctTTTggTTtc
M86N_antisense	gaaaccaaagcctggttcgcggagacggcaag
L41N_sense	ccacgtatcggccgaaacgccatgcgtattatcaagc
L41N_antisense	gcttgataatacgcgatggcgTTtcggccgatacgtgg
F79N_sense	cgcgcaaattgtggcgTTtaacatgcttgccgtctcc
F79N_antisense	ggagacggcaagcatgTTaaacgccacaatTTGCGCG
MscCG_I75S_fw	ggcgTTtatatcgcgcaatccgTggcgTTTTTcatg
MscCG_I75S_rv	catgaaaaacgccacggattgcgcgatataaacgcc
MscCG_I107S_fw	cattgcgtcagctgcctccggccttggtgcgcag
MscCG_I107S_rv	ctgcgcaccaaggccggaggcagctgacgcaatg
MscCG_V115S_fw	ccttggtgcgcagtcgatttccgcggacttcttggc
MscCG_V115S_rv	gccaaagaagtccgcggaaatcgactgcgcaccaagg

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die Überlassung des interessanten Themas, insbesondere für die intensive Unterstützung und sehr engagierte Betreuung dieser Arbeit und für das Ermöglichen des Forschungsaufenthalts in Sydney.

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

Bei Prof. Dr. Boris Martinac und seiner gesamten Arbeitsgruppe möchte ich mich für die erfolgreiche Kooperation, sowie tolle und lehrreiche Zeit am VCCRI in Sydney bedanken. Ein großer Dank gilt Dr. Takeshi Nomura, der mit einer riesigen Hilfsbereitschaft und japanischer Gelassenheit jederzeit Ratschläge parat hatte und zu jedem Problem eine Lösung kannte, sowie Charles „Junior“, für die vielen Diskussionen und für den Spaß im und außerhalb des Labors in „crazy Australia“.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Christine Ziegler, Katrin Rohde und Caroline Koshy für die Hilfe bei der Modellierung von MscCG.

Der gesamten Arbeitsgruppe und den Ehemaligen im „kleinen“ Labor, der Transport-Zellteilungs- und Zuckergruppe, allen TAs, Sekretärinnen und „Technikern“, die den Arbeitsalltag erleichterten und für ein tolles Arbeitsklima gesorgt haben. Besonders Kay, Gerd, Alex, Lina, Dimitar, Andreas, Natalie, Anna, Benni, Caro und Katja (auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit), die die Zeit im Labor, im Büro, in der Mensa und natürlich abseits des Instituts auf unterschiedliche Art und Weise bereichert haben. Bedanken möchte ich mich besonders bei den „Genossen“ Markus und Stan, die in unserem manchmal chaotischen Osmo-Labor, neben wissenschaftlichen Ratschlägen, immer mit russischen und anderen Weisheiten für gute Laune sorgten.

Allen Freunden danke ich für die Erinnerung an die Dinge des Lebens außerhalb des Labors.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich uneingeschränkt in meinen Entscheidungen unterstützt und mir immer den Rücken frei gehalten haben. Mein liebster Dank gilt Jenny für ihre Geduld und ihr Verständnis, sowie ihrer Unterstützung während und vor allem in der „Endphase“ der Doktorarbeit. Für alles das möchte ich mich von ganzem Herzen bei Euch bedanken!

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 der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Reinhard Krämer am Institut für Biochemie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln betreut worden.

Teilpublikationen:

Becker, M., K. Börngen, T. Nomura, A. R. Battle, K. Marin, B. Martinac and R. Krämer (2013). "Glutamate efflux mediated by *Corynebacterium glutamicum* MscCG, *Escherichia coli* MscS, and their derivatives." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1828**(4): 1230-1240.

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

Datum: Köln, Mai 2013

Unterschrift: