

Mechanismen des Zucker-Transports:  
Vergleichende elektrophysiologische Untersuchungen an  
Transportern der *major facilitator superfamily*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14 (Biochemie, Chemie, Pharmazie)  
der Johann Wolfgang Goethe -Universität  
in Frankfurt am Main

von

**Andre Bazzone**

aus Lich (Hessen)

Frankfurt, 2016  
(D30)



vom Fachbereich 14 (Biochemie, Chemie, Pharmazie) der  
Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Michael Karas

Erster Gutachter: Prof. Dr. Klaus Fendler  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Klaas Martinus Pos

30.01.2017

Datum der Disputation



# 0

---

## INHALT

---

### Inhaltsverzeichnis

#### TEIL 0: INHALT

*Inhaltsverzeichnis* iii  
*Eidesstattliche Versicherungen* x  
*Kurzzusammenfassung* xi  
*Zusammenfassung* xii

#### TEIL 1: EINLEITUNG

#### 1 BIOLOGISCHE MEMBRANEN 1

- 1.1 Das Ersatzschaltbild einer Membran 2
- 1.2 Potentiale an einer Lipiddoppelschicht 4
  - 1.2.1 Das intrinsische Membranpotential 5
  - 1.2.2 Das transmembrane Membranpotential 7
- 1.3 Die Membran als Barriere 8
  - 1.3.1 Die Born-Bild-Energie 9
  - 1.3.2 Selektive Permeabilität und Diffusionsfluss 9

#### 2 TRANSPORT ÜBER MEMBRANEN 10

- 2.1 Grundlegende Prinzipien des Membrantransports 11
  - 2.1.1 *Alternating Access* als Mechanismus für Carrier-vermittelten Transport 12
  - 2.1.2 Carrier-vermittelter Transport und Flusskopplung 13
  - 2.1.3 Vom idealen zum realen Cotransporter: Substratgradienten diktieren den Transportmodus 14
  - 2.1.4 Die Bedeutung von  $\Delta pH$  und  $\Delta\phi$  für PMF-gekoppelte Carrier 16
- 2.2 Zucker-Transporter der *major facilitator superfamily* (MFS) 18
  - 2.2.1 Phylogenetische Einordnung 19
  - 2.2.2 Strukturen repräsentieren unterschiedliche Konformationen im Reaktionszyklus 20
  - 2.2.3 *Alternating Access* und strukturelle Dynamik: Mehr als nur *rocker switch* 22

- 2.3 Formulierung eines minimalen kinetischen Modells 23
  - 2.3.1 Mutanten ohne Protonenbindestelle 25
  - 2.3.2 Anfangszustand und ratenlimitierende Reaktionen 25
  - 2.3.3 Symmetrie im Transportzyklus 27
  - 2.3.4 Reihenfolge der Substratbindung 28

### 3 ELEKTROPHYSIOLOGIE 29

- 3.1 Die elementare elektrogene Reaktion 29
- 3.2 Elektrophysiologische Methoden und die Untersuchung bakterieller Transporter 30
  - 3.2.1 Elektrophysiologische Methoden: Eine Einführung 31
  - 3.2.2 Modellmembransysteme in der Elektrophysiologie 31
- 3.3 Kapazitive Kopplung auf der SSM und Interpretation der Signale 33
  - 3.3.1 *Steady-state* und *pre steady-state* Signale auf der SSM 34
  - 3.3.2 Elektrophysiologie an LacY und biphasische Signale 36

## TEIL 2: METHODEN

### 1 CHEMIKALIEN-LISTE 38

### 2 MOLEKULARBIOLOGIE UND PROBENPRÄPARATION 39

- 2.1 Herstellung der Mutanten 39
  - 2.1.1 Vektoren 39
  - 2.1.2 Primer-Design und QuikChange PCR 40
  - 2.1.3 Plasmid-Präparation für die Sequenzierung 40
- 2.2 Proteinsynthese 40
  - 2.2.1 Transformation 40
  - 2.2.2 Proteinexpression 41
  - 2.2.3 Zellernte 41
  - 2.2.4 Zellaufschluss 41
  - 2.2.5 Isolierung der Membranfragmente 41
- 2.3 Proteinreinigung 41
  - 2.3.1 Einstellen der Proteinkonzentration 41
  - 2.3.2 Solubilisierung der Membranfragmente 42
  - 2.3.3 Reinigung mit Ni-NTA Säule 42
  - 2.3.4 Konzentrierung und Pufferaustausch 42
  - 2.3.5 Protein-Ausbeuten 42
- 2.4 Rekonstitution 43
  - 2.4.1 Präformation der Liposomen 43
  - 2.4.2 Rekonstitutionsansatz 43
  - 2.4.3 Rekonstitution mit Bio-Beads 43
  - 2.4.4 Rekonstitution durch Verdünnung 44

### 3 SSM-BASIERTE ELEKTROPHYSIOLOGIE 44

- 3.1 Konfiguration der Setups 44
  - 3.1.1 Bestimmung der Zeitauflösung 44
  - 3.1.2 Flussprotokolle 46
  - 3.1.3 Ventilkonfiguration und Küvetten 47

3.2	Vorbereitung des Setups	49
3.2.1	Regenerierung der Gelbrücke und Referenzelektrode	49
3.2.2	Herstellung des SSM-Lipids	49
3.2.3	Vorbereitung des Schlauch-Ventil-Systems	49
3.2.4	Vorbereitung des Sensors	49
3.2.5	Bestimmung der Membran-Parameter	49
3.2.6	Zugabe der Proteoliposomen	50
3.3	Ablauf der Messungen	51
3.3.1	Vorbereitung der Messpuffer	51
3.3.2	Einzelmessungen	51
3.3.3	<i>Rundown</i> -Kontrolle	51
3.3.4	Inkubationszeiten nach Pufferwechsel	51
3.4	Herstellung der Messpuffer	52
3.4.1	Herstellung des Grundpuffers	52
3.4.2	Zusätze im Grundpuffer	52
3.4.3	Herstellung von NA- und A-Lösung	52
4	AUSWERTUNG DER SSM-SIGNALE UND BESTIMMUNG DER PARAMETER	52
4.1	<i>Rundown</i> -Korrekturen	52
4.2	Bestimmung von Peakstrom, Ladungsverschiebung und Abklingzeit	53
4.3	Darstellung von transienten Strömen	53
4.4	Bestimmung von KD- und KM-Werten	53
4.5	Relation zwischen KS-, KD- und KM-Werten	55
4.6	Bestimmung der pK-Werte mittels Titrationsgleichung	56
4.7	Bestimmung des pK-Wertes der Zuckerbindung mittels Modellgleichung	57
4.8	Anpassung der NA-Zeit-Abhängigkeit der Peakströme	58
4.9	Rekonstruktion der Transporterströme	58
5	KINETISCHE MODELLE UND SIMULATIONEN	59
5.1	Das 8-Zustands-Modell	59
5.3	Das 6-Zustands-Modell (MKM)	60
5.2	Das 4-Zustands-Modell	64
6	FLUORESZENZMESSUNGEN	65
6.1	Messungen mit Pyranin	65
6.1.1	Kalibrierung	65
6.1.2	Probenvorbereitung reiner Lipid-Vesikel	66
6.1.3	Probenvorbereitung Proteoliposomen	66
6.1.4	Entfernen von Pyranin im äußeren Medium	66
6.1.5	Ablauf der Messreihen	67
6.1.6	Anpassung der Zeit-abhängigen pH-Änderung mit biexponentieller Funktion	67
6.1.7	Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten für Protonen	68

- 6.2 Messungen mit DISC3(5) 68
  - 6.2.1 Kalibrierung 69
  - 6.2.2 Probenvorbereitung 71
  - 6.2.3 Ablauf der Messreihen 71
  - 6.2.4 Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten für Kalium 72

## 7 TRANSPORTASSAYS MIT RADIOAKTIV MARKIERTEN SUBSTRATEN 72

- 7.1 Messungen an wt GlcP 72
- 7.2 Messungen an D46N und wt FucP 73

## TEIL 3: ERGEBNISSE

### 1 STEADY-STATE UND PRE STEADY-STATE 74

- 1.1 Wt Transporter und *only-Exchange* (OE) Mutanten im Vergleich 74
- 1.2 Variation der LPR: Ein Hinweis auf *steady-state* Signale 76

### 2 ZUCKER-SPEZIFITÄT IN *E. COLI* TRANSPORTERN 79

- 2.1 Zucker-Spezifität der wt Transporter 79
  - 2.1.1 Bestimmung der KM-Werte: Michaelis-Menten- oder Hill-Fit 80
  - 2.1.2 Die KM-Werte steigen mit dem pH-Wert 82
  - 2.1.3 Verschiedene Substrate zeigen abweichende KM- und  $v_{max}$ -Werte 83
- 2.2 Zucker-Spezifität der OE-Mutanten: KD-Werte und Ladungsverschiebungen 86
- 2.3 Ein Vergleich zwischen KD- und KM-Werten 89

### 3 DIE STABILITÄT VON PH-GRADIENTEN 90

- 3.1 Messungen mit dem pH-sensitiven Farbstoff Pyranin 90
- 3.2 Messungen mit dem Potential-sensitiven Farbstoff DISC3(5) 94
- 3.3 Ein Modell für die biphasische Dissipation von pH-Gradienten 95
- 3.4 Ableitung von Permeabilitätskoeffizienten 96
- 3.5 Konsequenzen für pH-abhängige Messungen an der SSM 98

### 4 PH-ABHÄNGIGKEIT DER *E. COLI* TRANSPORTER BEI SYMMETRISCHEN PH-WERTEN 98

- 4.1 Isotopeneffekte: Messungen in D<sub>2</sub>O 98
- 4.2 pH-Abhängigkeit des *steady-states* und Titrationsmodell 101
  - 4.2.1 Das pH-Profil aller *E. coli* Transporter zeigt mindestens zwei pK-Werte 101
  - 4.2.2 pH-Profile haben breite Aktivitätsplateaus: Überlegungen zur Ratenlimitierung 103
  - 4.2.3 Transiente Ströme und *pre steady-state* Komponenten 104
- 4.3 pH-Abhängigkeit der *pre steady-state* Reaktion: OE-Mutanten und wt im Vergleich 106

### 5 EINFLUSS ASYMMETRISCHER PH-WERTE 109

- 5.1 NA-Zeit-Abhängigkeit der Peak-Ströme 109
- 5.2 Gradientenmessungen mit minimaler NA-Zeit und Monensin-Kontrollen 112
- 5.3 Effekt des Potentials auf die Gradientenmessungen 116

6	MESSUNGEN AN GLCP	117
6.1	pH-Abhängigkeit in wt und D22N GlcP an der SSM	117
6.2	Zuckerspezifität in wt GlcP	120
6.3	Einfluss eines pH-Gradienten auf den Transportmodus	122
6.4	pH-Abhängigkeit des Zucker-Austauschs im radioaktiven Transportassay	125
7	D-GLUCOSE UND XYLE	126
7.1	D-Glucose und wt Xyle	128
7.2	D-Glucose und D27N Xyle	129
7.3	D-Glucose und Q175I/L297F Xyle	130
8	KINETISCHE SIMULATIONEN	133
8.1	<i>Detailed Balance</i> Kinetik	133
8.1.1	Simulation mit <i>Detailed Balance</i> Bedingung	135
8.2	Vergleichende Simulationen für LacY, FucP und Xyle	138
8.1.3	Simulation der pK-Werte	138
8.1.4	Simulation der KM-Werte	139
8.1.5	Rückwärtsraten des beladenen Carriers	140
8.3	Die optimalen pKi- und pKo-Werte unter <i>in vivo</i> Bedingungen	141
8.3.1	Die äußeren Gegebenheiten <i>in vivo</i>	141
8.3.2	Parameter und Potential-Abhängigkeit	141
8.3.3	Simulationen mit symmetrischen pH-Werten	142
8.3.4	Simulationen mit pH-Gradienten	143
<b>TEIL 4: DISKUSSION</b>		
1	DAS 8-ZUSTANDS-MODELL BESCHREIBT ALLE TRANSPORTMODI	147
1.1	Das 8-Zustands-Modell beschreibt GlcP und die <i>E.coli</i> Transporter	147
1.2	Bindung und Freisetzung der Substrate erfolgen nicht geordnet	151
1.3	Konformationsänderung im protonierten Carrier (PH)	153
1.4	Konformationsänderung im unprotonierten, beladenen Carrier (PS)	153
2	JEDER TRANSPORTER ZEIGT ZWEI ELEMENTARE ELEKTROGENE REAKTIONEN	155
2.1	Der Transfer der negativ geladenen Protonenbindestelle ist elektrogen	155
2.1.1	Der leere Carrier bestimmt die Elektrogenität im Symport-Modus	155
2.1.2	Der beladene Carrier bestimmt die Elektrogenität in wt GlcP bei $\text{pH} > \text{pKb}$	156
2.2	Die Elektrogenität im <i>induced fit</i> des Zuckermoleküls ist nicht konserviert	157
2.2.1	Die vier Transporter zeigen unterschiedliche Ladungsverschiebungen	158
2.2.2	Die <i>pre steady-state</i> Reaktion ist eine frühe im Reaktionszyklus	159
2.2.3	Interner Protonentransfer oder Bewegung geladener Aminosäuren	160
2.2.4	Es handelt sich um einen kollektiven Effekt	162
2.3	Ladungsbilanz im <i>steady-state</i> Symport	163

3 DIE RATENLIMITIERENDE REAKTION IM SYMPORT IST ABHÄNGIG VON pH, ZUCKERSUBSTRAT UND POTENTIAL	165
3.1 Unterhalb des pKa-Wertes definiert der leere Carrier die Umsatzrate	166
3.2 Oberhalb des pKb-Wertes ist die Protonenbindung ratenlimitierend	167
3.3 Das Zuckersubstrat beeinflusst die Ratenkonstante des beladenen Carriers	168
3.3.1 Die Teilreaktionen im beladenen Carrier	169
3.3.2 Die Substrattranslokationsrate sinkt mit steigender Affinität	170
3.3.3 Jedes Substrat induziert eine andere Transporter-Konformation	171
3.3.4 Der Transport von D-Lactose in LacY bei pH 7,5	174
3.3.5 Die Bildung des okkludierten Zustands ist nicht elektrogen	174
3.4 Membranpotential und Substrate beeinflussen das pH-Profil	175
4 EIN pK-SWITCH-MODELL FÜR <i>E. COLI</i> TRANSPORTER	179
4.1 Die Implementierung der pK-Verschiebung im MKM ist mit Problemen verbunden	179
4.1.1 Extreme Ratenkonstanten für globale Konformationsänderungen	180
4.1.2 Asymmetrie von Influx und Efflux	181
4.1.3 Das Problem der topologischen Zuordnung der pK-Werte	182
4.2 Ein symmetrisches Transportmodell	183
4.3 Ein molekularer pK-switch-Mechanismus im symmetrischen Modell	185
4.4 Das Problem der Orientierung	188
5 DIE FLUSSKOPPLUNG IN GLCP UND DEN <i>E. COLI</i> TRANSPORTERN UNTERSCHIEDET SICH	190
5.1 Das Mysterium des idealen Symporters	190
5.1.1 GlcP und die <i>E. coli</i> Transporter zeigen wesentliche Unterschiede	190
5.1.2 GlcP und <i>E. coli</i> Transporter wurden als Symporter klassifiziert	192
5.2 Die Substratgradienten beeinflussen den Transportmodus	192
5.2.1 Ohne Membranpotential katalysiert GlcP Uniport, Symport und Antiport	193
5.2.2 <i>In vivo</i> katalysiert GlcP Symport	194
5.3 Flusskopplung auf der Ebene der Konformationsänderungen	196
5.4 Flusskopplung auf der Ebene der Substratbindung	197
6 INHIBITION VON XYLE DURCH D-GLUCOSE	198
6.1 Wt und Q175I/L297F XylE zeigen zwei elektrogene Reaktionen	198
6.2 Ein kinetisches Modell für die Reaktion von D-Glucose mit wt XylE	199
6.3 Überlegungen zur Flusskopplung	200

## TEIL 5: VERZEICHNISSE

*Literaturverzeichnis* xvi

*Abkürzungsverzeichnis* xxvii

*Variablenverzeichnis* xxvii

*Danksagung* xxix

## TEIL 6: ANHANG

- 1 Empirische pK-Kalkulationen A1
- 2 Verschiedene Substrate induzieren unterschiedliche Interaktionsnetzwerke A6
- 3 Messungen an D46N FucP A11
- 4 Elektrophysiologische Charakterisierung von I172A XylE A13
- 5 Elektrophysiologische Charakterisierung von I105S GlcP A15
- 6 Inhibition von GlcP mit GLUT Inhibitoren A17
- 7 Bestimmung der Orientierung von FucP in Proteoliposomen A18
- 8 Elektronenmikroskopische Gefrierbruchaufnahmen von D46N und wt FucP A19
- 9 Herleitung der Umsatzrate im MKM A20
- 10 Ein molekularer Mechanismus für Flusskopplung und pK-*switch* in LacY, FucP, XylE und GlcP A21

## Eidesstattliche Versicherungen

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation über

*Mechanismen des Zucker-Transports: Vergleichende elektrophysiologische Untersuchungen an Transportern der major facilitator superfamily*

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind. Ich versichere, die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis beachtet, und nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt am Main, den 20.04.2016



Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung im Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Bereich unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den 20.04.2016



## Kurzzusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der vergleichenden funktionalen Charakterisierung der *E.coli* Transporter LacY, FucP und Xyle und des Glucose-Transporters GlcP aus *Staphylococcus epidermidis* sowie funktionsrelevanter Mutanten. Sie katalysieren *in vivo* den PMF-gekoppelten Zuckertransport und repräsentieren die *major facilitator superfamily* (MFS), einer der größten Transporter-Familien überhaupt. Die Studien wurden mithilfe einer elektrophysiologischen Methode auf Basis Festkörper-unterstützter Membranen (SSM) durchgeführt. Komplementär dazu wurden radioaktive Transportassays, fluorometrische Messungen, kinetische Simulationen und theoretische Berechnungen auf Basis der 3D-Strukturen durchgeführt. Experimentell bestimmte Zucker- und pH-Abhängigkeiten elektrogener *steady-state* und *pre steady-state* Reaktionen wurden verwendet, um ein allgemeingültiges kinetisches Modell aufzustellen.

Insgesamt konnten bei allen Transportern zwei elementare elektrogene Reaktionen identifiziert werden. Eine schnelle Zucker-induzierte Konformationsänderung wurde dem *induced fit* des Zuckermoleküls zugeordnet. Die Elektrogenität im *steady-state* wird dagegen durch den langsamen Transfer der negativ geladenen Protonenbindestelle bestimmt. Die für den Symport ratenlimitierende Reaktion ist abhängig von den äußeren Bedingungen wie pH-Werten, Zuckerkonzentrationen, Substrat-Spezies und Membranpotential meist die Konformationsänderung des leeren (P) oder des beladenen (PSH) Carriers, welche die Substratbindestellen im Zuge des *Alternating Access* über die Membran transferieren. Ein Wechsel zwischen hohen Protonenbindungs-pK-Werten und niedrigen Protonenfreisetzung-pK-Werten durch weitere lokale Konformationsänderungen ist zentraler Bestandteil des Transportmechanismus. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Kopplung zwischen Zucker- und Protonen-Translokation, die sich zwischen *E.coli* Transportern und GlcP strikt unterscheidet. In *E.coli* Transportern erfolgt eine kooperative Bindung von Zucker und Proton. Zudem erfolgt keine Konformationsänderung im Zucker-gebundenen, unprotonierten Carrier (PS). In GlcP ist die Kopplung erheblich reduziert. Der Transport-Modus selbst ist abhängig von den äußeren Bedingungen. So katalysiert GlcP abhängig vom pH-Gradienten Uniport, Symport oder Antiport.

Die vorliegende Arbeit leistet einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des PMF-gekoppelten Zuckertransports und zeigt die Grenzen des für LacY formulierten 6-Zustands-Modells mit nur zwei Konformationsänderungen auf. Ein erweitertes 8-Zustands-Modell mit vier Konformationsänderungen, die unterschiedliche Ratenkonstanten aufweisen können, erklärt sowohl Symport, Antiport als auch Uniport und berücksichtigt zudem die zahlreichen Ergebnisse für LacY aus der Literatur.

## Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der vergleichenden funktionalen Charakterisierung verschiedener Zuckertransporter der *major facilitator superfamily* (MFS), die *in vivo* den PMF-gekoppelten Symport eines Zuckermoleküls in die Zelle katalysieren. Während Unterschiede zwischen den Transportern für sich genommen interessant sind, erlauben Gemeinsamkeiten Rückschlüsse auf essentielle Bestandteile im Transportmechanismus. Im Fokus stehen die drei Zucker-Transporter aus *Escherichia coli* LacY, FucP und XylE, der Glucose-Transporter GlcP aus *Staphylococcus epidermidis* sowie funktionsrelevante Mutanten. Die MFS ist mit bisher über 10.000 sequenzierten, strukturell verwandten Mitgliedern einer der größten Transporter-Familien überhaupt. *Alternating Access* gilt als allgemein anerkanntes Transportmodell. Darüber hinaus geht das Verständnis des Transportmechanismus jedoch kaum. Trotz der Vielzahl an kinetischer Parameter, die aufgrund der 40-jährigen Forschungsgeschichte für den prototypischen MFS-Transporter LacY in der Literatur zur Verfügung stehen, fehlt eine widerspruchsfreie Erklärung durch ein konkretes Transportmodell.

Die vergleichenden Studien wurden mithilfe einer elektrophysiologischen Methode auf Basis einer Festkörper-unterstützten Membran (SSM) durchgeführt. Dazu werden Proteoliposomen auf einem Sensor adsorbiert und der infolge eines schnellen Lösungswechsels resultierende kapazitiv gekoppelte Transporterstrom detektiert. Die SSM-basierte Elektrophysiologie bietet eine hohe mechanische Stabilität bei gleichzeitig hoher Zeitauflösung und ermöglicht daher die Bestimmung einer Vielzahl kinetischer Parameter von *steady-state* und *pre steady-state* Reaktionen. Insbesondere erlaubt diese Methode auch prokaryotische Transporter zu untersuchen, die für konventionelle elektrophysiologische Methoden schwer zugänglich sind. Die Herausforderung liegt in der Interpretation der Ergebnisse. So werden *steady-state* und *pre steady-state* Reaktionen im kapazitiv gekoppelten System als transiente Ströme detektiert. Für die korrekte Interpretation der Daten und der Zuordnung der Signale zu elektrogenen Reaktionen im Transportzyklus sind gute Kontrollen erforderlich. Zudem stellt sich das radioaktive Transportassay als essentielles Hilfsmittel heraus, um Uniport bei fehlender *steady-state* Elektrogenität nachzuweisen. Allein elektrophysiologische Methoden können kein vollständiges Bild des Transports zeichnen.

Die vergleichenden Studien umfassen Substratspezifität sowie pH-Abhängigkeit der *steady-state* und *pre steady-state* Reaktionen, den Einfluss von pH-Gradienten auf die Transportaktivität und die kinetische Analyse verschiedener elektrogener Teilreaktionen. Die hier präsentierten elektrophysiologischen Daten werden komplementiert durch Ergebnisse aus radioaktiven Transportassays, kinetischen Simulationen und Struktur-basierten theoretischen Berechnungen. Letztere sind das Ergebnis einer Kollaboration mit Dr. Gregor Madej. Zudem wird eine detaillierte

Betrachtung der Stabilität von pH-Gradienten über biologische und synthetische Membranen von Liposomen und Proteoliposomen auf Basis fluorometrischer Messungen mit pH- und Potential-sensitiven Farbstoffen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich in fünf wesentliche Aspekte zerlegen.

**Elektrogene Reaktionen.** Insgesamt konnten zwei elementare elektrogene Reaktionen im Transportzyklus aller vier untersuchten Transporter identifiziert werden. Zum einen wird eine schnelle Zucker-induzierte Konformationsänderung detektiert, die dem *induced fit* des Zuckermoleküls zugeordnet werden konnte. Sie verschiebt abhängig vom Transporter, pH-Wert und Zuckersubstrat < 0,5 % bis 50 % einer Elementarladung. Der *induced fit* kann als *pre steady-state* Reaktion in den OE-Mutanten der vier Transporter, bei denen die Protonenbindestelle durch eine neutrale Aminosäure substituiert ist, isoliert vom elektrogenen *steady-state* der wt Transporter betrachtet werden. Die zweite charakterisierte elektrogene Reaktion ist der langsamere Transfer der negativ geladenen Protonenbindestelle über die Membran, wobei genau eine Elementarladung verschoben wird. So bestimmt die Konformationsänderung des leeren Carriers (P) nach der Protonenfreisetzung die Elektrogenität des *steady-state* Symports der *E.coli* Transporter. In GlcP wird analog dazu auch die Zucker-induzierte Konformationsänderung im unprotonierten Carrier (PS) als elektrogene *pre steady-state* Reaktion detektiert.

**Ratenlimitierende Reaktionen.** Die Umsatzrate wird abhängig von den äußeren Bedingungen durch verschiedene Teilreaktionen im Transportzyklus limitiert. Das pH-Profil der *E.coli* Transporter zeigt eine Glockenkurve mit mindestens zwei Transporter-spezifischen pK-Werten und einem breiten pH-Optimum. Im sauren pH-Bereich bestimmt die effektive Rate der Konformationsänderung des leeren Carriers durch das vorgelagerte Gleichgewicht der Protonenfreisetzung die Umsatzrate. Dies wird durch den Nachweis des kinetischen Isotopeneffekts mit Messungen in D<sub>2</sub>O bestätigt. Bei extrem basischen pH-Werten hingegen wird die Protonenbindung selbst ratenlimitierend, während sich KM- und KD-Werte nur geringfügig erhöhen. Messungen mit pH-Gradienten ermöglichten darüber hinaus die Zuordnung der pK-Werte zur intraliposomalen Protonenfreisetzung bzw. extraliposomalen Protonenbindung. Neben dem pH-Wert hat auch die Substrat-Spezies Einfluss auf die Transportrate, sodass auch die Konformationsänderung des beladenen Carriers ratenlimitierend werden kann. Dagegen ist die Ratenkonstante des *induced fits* für alle Substrate mit > 300 s<sup>-1</sup> schnell. Der Einfluss des Substrats auf die *pre steady-state* Ladungsverschiebungen sowie die Interaktionsnetzwerke der Transporter bestätigt, dass verschiedene Zucker unterschiedliche Transporter-Zustände induzieren. Diese beeinflussen die Energieniveaus der metastabilen Substrat-okkludierten Konformationen und beeinflussen neben dem KD-Wert die Aktivierungsenergie der ratenlimitierenden Reaktion im Zuckertranslokationsweg.

**Der pK-switch Mechanismus.** LacY ist in der Literatur als symmetrischer Transporter beschrieben. Im elektrophysiologischen Influx-Experiment haben Protonenbindung und -freisetzung jedoch asymmetrische pK-Werte. Kinetische Simulationen zeigen, dass die pK-Werte nicht fest mit der peri- bzw. zytoplasmatischen Seite des Transporters assoziiert sind. Sie sind wahrscheinlich eine Folge der Transportrichtung. Theoretische pK-Berechnungen auf Basis der 3D-Strukturen zeigen, dass beide pK-Werte in jedem der drei *E.coli* Transporter einer einzelnen Aminosäure zuzuordnen sind. Der pK-switch erfolgt möglicherweise durch elektrostatische Kopplung zwischen der Protonenbindestelle und anderen Seitenketten infolge lokaler Konformationsänderungen.

**Mechanismen der Flusskopplung.** Ein zentraler Aspekt des Transportmechanismus ist die Kopplung zwischen Zucker- und Protonen-Translokation. Die pH-Abhängigkeit der gemessenen KM-Werte und die 3D-Strukturen zeigen, dass in *E.coli* Transportern eine kooperative Bindung von Zucker und Proton erfolgt. Der Zucker bindet jedoch bei allen Transportern auch an den unprotonierten Carrier: Auch oberhalb des pK-Wertes wird der elektrogene *induced fit* detektiert. Da der D-Glucose-Bindung an wt XylE eine *pre steady-state* Protonentranslokation folgt, sind Kopplungsmechanismen auch bei der Freisetzung der Substrate relevant. Die Flusskopplung in den *E.coli* Transportern unterscheidet sich sehr von der Flusskopplung in GlcP. GlcP katalysiert abhängig von der Richtung des pH-Gradienten Symport oder Antiport. Im Gegensatz zu den *E.coli* Transportern zeigt GlcP im Experiment ohne pH-Gradienten keinen elektrogenen *steady-state*. Die Unterschiede zwischen GlcP und den *E.coli* Transportern könnten auf der Ebene der Konformationsänderungen zu finden sein. Während GlcP zur Konformationsänderung im unprotonierten, Zucker-gebundenen Carrier befähigt ist, zeigen *E.coli* Transporter kein äquivalentes *pre steady-state* Signal. So diktiert in GlcP äußere Bedingungen wie Membranpotential, pH-Werte und Zuckergradienten den Transportmodus.

**Ein kinetisches Modell für alle Transporter.** Die vorliegende Arbeit leistet einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des PMF-gekoppelten Zuckertransports in Transportern der MFS. Insbesondere konnten die Grenzen des für LacY oder SGLT formulierten 6-Zustands-Modells mit zwei Konformationsänderungen (P und PHS) aufgezeigt werden. So zeigt unter anderem der Nachweis von Zucker-Efflux im radioaktiven *Counterflow*-Experiment mit der OE-Mutante von FucP, dass auch der neutralisierte Carrier (PH) die Membran passieren kann. Das radioaktive *Exchange*-Experiment bei pH-Werten  $> pK_b$  zeigt für GlcP, dass auch der unprotonierte, Zucker-gebundene Carrier (PS) die Membran passiert. Ein erweitertes 8-Zustands-Modell mit vier Konformationsänderungen erklärt ohne komplizierte Kopplungsmechanismen sowohl Symport, Antiport als auch Uniport in Abhängigkeit von den anliegenden pH- und Substratgradienten. In den *E.coli* Transportern könnten günstig liegende Ratenkonstanten der Konformationsänderungen sowie kooperative Substrat-Bindung und -Freisetzung eine erhöhte Symportrate bewirken.

# 1

---

## EINLEITUNG

---

### Biologische Membranen

Eine biologische Membran fungiert als selektive Barriere und mechanische Stabilisierung und definiert dadurch die Kompartimente innerhalb einer Zelle sowie die Grenze zwischen Zellinnerem und Zelläußerem [1]. Zudem repräsentiert die Membran selbst ein Kompartiment, das für Proteinfaltung und Protein-Aktivität essentiell ist.

Eine biologische Membran besteht etwa zu gleichen Anteilen (w/w) aus Lipiden und Proteinen. Die LPR (w/w) variiert von etwa 0,3 für bakterielle Membranen bis 4 für die lipidreiche Myelin-Membran [2]. Membranproteine vermitteln Signalweiterleitung, selektiven Stofftransport zwischen den einzelnen Kompartimenten, aber auch die Speicherung von Energie im elektrochemischen Protonengradienten, alles zur Regulierung und Aufrechterhaltung der Stoffwechselaktivitäten eines Organismus.

Die Struktur der Membran wird durch die Amphiphilität der Membranlipide bestimmt [3, 4]. Sie bilden in wässrigem Medium aufgrund des Hydrophoben Effekts [5, 6] und Van-der-Waals-Wechselwirkungen spontan eine Lipiddoppelschicht [7]. Vollständig dehydratisierte hydrophobe Fettsäureketten lagern sich zusammen. Die hydrophilen Kopfgruppen interagieren über Coulomb-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken-Bindungen mit dem umgebenden, wässrigen Medium. Fest gebundene Wasser-Moleküle machen 20 % der Gesamtmasse einer biologischen Membran aus: dreiviertel aller Moleküle innerhalb der Membran werden über Wasserbrücken zusammengehalten [8]. Sie sind für die Aufrechterhaltung der Membranstruktur verantwortlich. Gebundene Kationen wirken zusätzlich stabilisierend.

## Das Ersatzschaltbild einer Membran

Eine biologische Membran zeigt das Verhalten eines Plattenkondensators mit der Kapazität  $C$  (*Gleichung G1*) [9].

$$C = \epsilon_r \epsilon_0 \cdot \frac{A}{d} = \epsilon \cdot \frac{A}{d} \quad \mathbf{G1}$$

$$\text{mit } \epsilon_0 = 8,854 \cdot 10^{-12} \frac{\text{As}}{\text{Vm}} \text{ und } \epsilon_r \approx 2$$

*C: Kapazität;  $\epsilon_r$ : relative Permittivität;  $\epsilon_0$ : Permittivität des Vakuums;  $\epsilon$ : Permittivität;  
A: Membranfläche; d: Membrandicke*

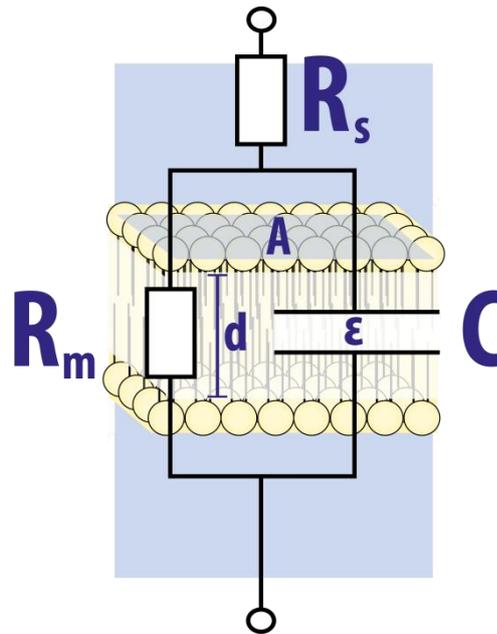
Die Kapazität wird maßgeblich durch die Permittivität des hydrophoben Membraninneren bestimmt. Je niedriger die Permittivität, desto isolierender wirkt ein Material. Durch die Orientierung ortsfester, geladener Dipole wird das Material polarisiert [10, 11], wodurch es elektrische Felder um den Faktor  $\epsilon_r$  besser leiten kann als das Vakuum. Unpolare Lösungsmittel haben daher im Allgemeinen eine geringere Permittivität als polare Lösungsmittel. Neben den Kondensator-Eigenschaften (*Gleichung G1*) wird auch die Energiebarriere für die Diffusion von Ladungsträgern über die Membran (*Seite 9, Gleichung G11*) direkt durch die niedrige relative Permittivität der hydrophoben Lipidbestandteile ( $\sim 2$ ) im Vergleich zu Wasser ( $\sim 80$ ) bestimmt. Tatsächlich nimmt die Permittivität mit dem Abstand zur hydrophoben Lipidschicht stetig zu [12–14], insbesondere an der Grenzfläche zwischen hydrophoben Fettsäuren und hydrophilen Kopfgruppen im Bereich des Glycerin-Rests (*Seite 7, Abbildung 4a*). Dort existiert eine ca. 3 Å dünne teilweise-hydratisierte Schicht, in der die Wasserkonzentration von 2 M auf nahe 0 M sinkt [15, 16].

Eine Membran muss jedoch als realer Kondensator betrachtet werden. Solche haben zusätzlich intrinsische Widerstände [17–19]. Es sind der Serienwiderstand  $R_S$  und der Parallelwiderstand  $R_m$  zu berücksichtigen (*Abbildung 1*). Im Allgemeinen gilt für den elektrischen Widerstand  $R$  bzw. die Leitfähigkeit  $g$  die *Gleichung G2* [9]. Wird ein idealer Kondensator mit einer konstanten Gleichspannungsquelle verbunden, ist der Strom am Kondensator nicht begrenzt. Es erfolgt die instantane Aufladung mit der Quellspannung (*Gleichung G3*).

$$g = \frac{1}{R} = \frac{I}{U} \quad \mathbf{G2}$$

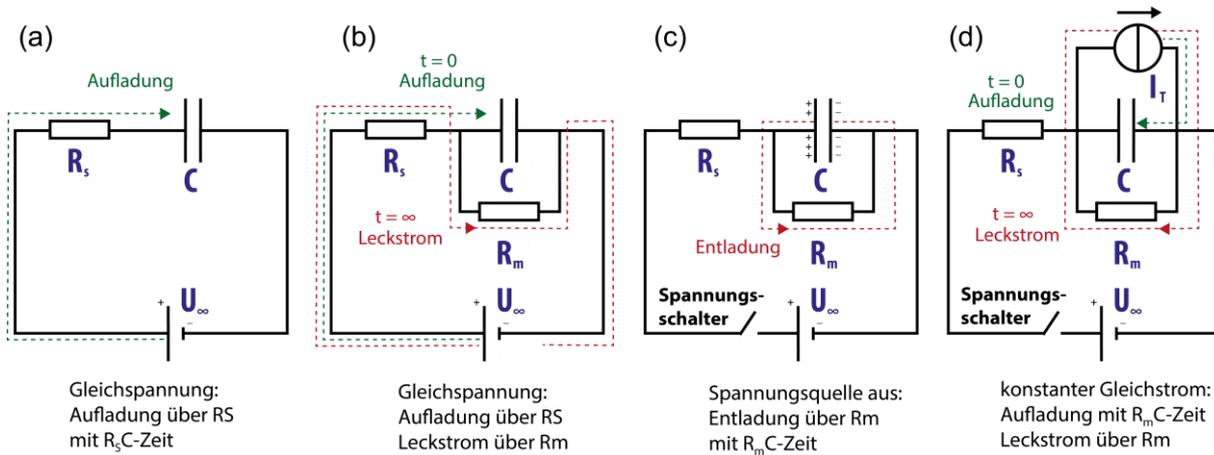
$$Q = CU_\infty = Idt \quad \mathbf{G3}$$

*g: Leitfähigkeit; R: Widerstand; U: Spannung; I: Strom; Q: Ladung am Kondensator;  $U_\infty$ : Quellspannung*



**Abbildung 1: Das Ersatzschaltbild einer Membran gleicht dem eines realen Kondensators.** Das Ersatzschaltbild einer Membran berücksichtigt die verlustfreie Kapazität  $C$ , den Widerstand des Dielektrikums  $R_m$  und den Zuleitungswiderstand  $R_s$ . Die Kapazität ist abhängig von der Dielektrizitätskonstanten  $\epsilon$ , der Dicke  $d$  und der Fläche  $A$  der Membran.

Unter realen Bedingungen existieren Zuleitungswiderstände ( $R_s$ ), die im Ersatzschaltbild als Serienwiderstand gezeichnet werden. Sie ergeben sich für eine biologische Membran durch das umgebende wässrige Medium und die Lipidkopfgruppen. Dies führt bei Anliegen einer Gleichspannung zu einer verzögerten Aufladung des Kondensators mit der Zeitkonstanten  $\tau_m = R_s C$  (*Abbildung 2a*); Der Strom am Kondensator ist aufgrund des Widerstands begrenzt. Der Ladestrom geht für große Zeiten gegen null, wobei nach etwa  $5 \cdot \tau_m$  der Kondensator mit einer Spannung von  $0,99 \cdot U_\infty$  als vollständig geladen betrachtet werden kann. Unter realen Bedingungen besitzt auch das Dielektrikum der Membran eine endliche Leitfähigkeit. Aus diesem Grund wird im Ersatzschaltbild der Membran zusätzlich ein parallel geschalteter Widerstand ( $R_m$ ) eingeführt.  $R_m$  sorgt dafür, dass der Strom für große Zeiten nicht gegen null geht, weil der Kondensator vollständig geladen ist. Stattdessen fließt bei  $t = \infty$  ein konstanter Leckstrom über  $R_m$  (*Abbildung 2b*). Wird der Kondensator von der Spannungsquelle genommen, erfolgt auch die Entladung des Kondensators mit  $\tau_m = R_m C$  (*Abbildung 2c*). Ohne  $R_m$  bliebe der Kondensator nach Entfernen der Spannungsquelle vollständig geladen. Wird in den Stromkreis statt der Spannungsquelle eine konstante Stromquelle integriert, so ist der Strom am Kondensator auch ohne vorhandenen Serienwiderstand begrenzt (*Abbildung 2d*). Als konstante Stromquelle könnte ein elektrogener Membrantransporter innerhalb der Membran fungieren. Bedingt durch  $R_m$ , erfolgt dann auch die Aufladung des Kondensators mit der RC-Zeit. Bei  $t = 0$  ist die Spannung am Kondensator null, sodass der Strom zum Kondensator fließt. Steigt die Spannung am Kondensator, fließt anteilig mehr Strom über  $R_m$ . Ist der Kondensator vollständig geladen, fließt über  $R_m$  ein konstanter Leckstrom.



**Abbildung 2: Ersatzschaltbilder zur Veranschaulichung von Lade- und Entladevorgängen an realen Kondensatoren.** (a) Ladevorgang eines realen Kondensators bei Gleichspannung. (b) Ladevorgang eines realen Kondensators unter Berücksichtigung von  $R_m$  bei Gleichspannung. Der Strom am Kondensator ist durch  $R_s$  begrenzt.  $R_m$  bedingt einen konstanten Leckstrom. (c) Entladevorgang über den parallel geschalteten Widerstand nach Entfernen der Spannungsquelle. (d) Ladevorgang mit einer parallel geschalteten, konstanten Stromquelle. Zunächst fließt der Strom in den Kondensator, später anteilig immer mehr über  $R_m$ , sodass ein konstanter Leckstrom resultiert.

Über eine Membran fließt also sowohl bei Anlegen einer Gleichspannung über eine Referenzspannungsquelle (bedingt durch  $R_s$ ) (*Abbildung 2a*), als auch bei Aktivierung inkorporierter, elektrogener Membrantransporter infolge von Substratsprüngen (bedingt durch  $R_m$ ) (*Abbildung 2d*) ein kapazitiver Strom. Unter den genannten Voraussetzungen sind Membranpotential  $U(t)$  und kapazitiver Strom  $I(t)$  bei Ladung und Entladung des Membrankondensators zeitabhängig und von der jeweiligen RC-Zeit bestimmt. Die *Gleichungen G4* und *G5* beschreiben den zeitlichen Verlauf der Ladespannung und des Ladestroms (*Abbildung 3*) [9]. Es ist anzumerken, dass bei Betrachtung eines realen Kondensators mit  $R_s$  und  $R_m$  der Lade- und Entladevorgang von beiden Widerständen abhängig sein kann, wenn sowohl ein konstanter Gleichstrom als auch eine Spannung anliegt.

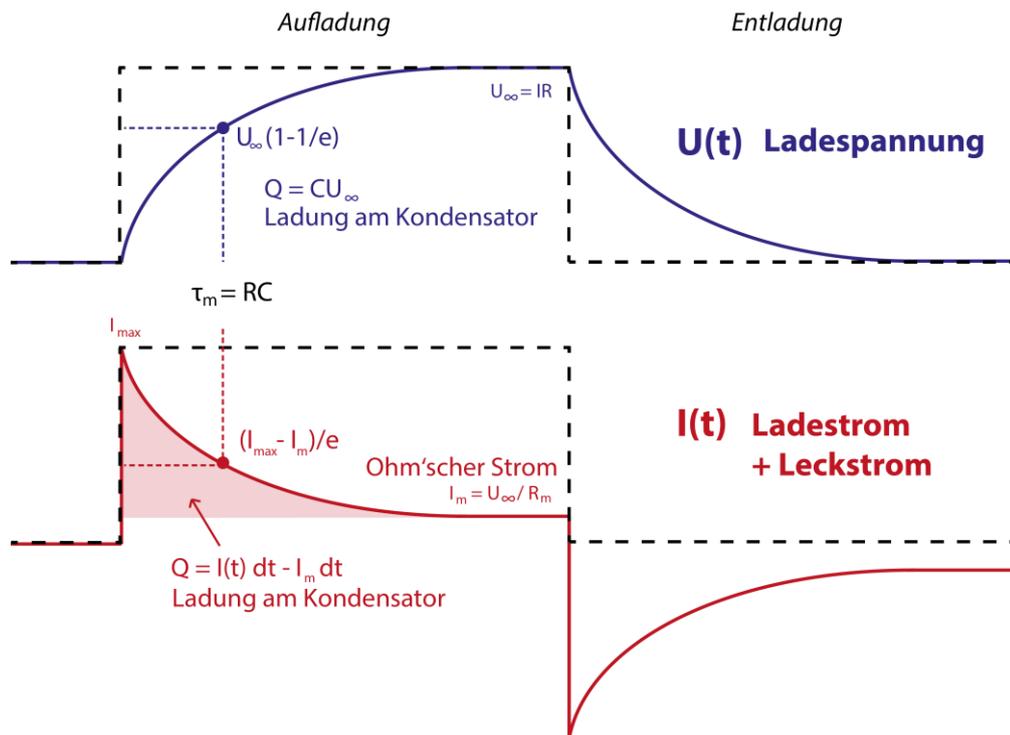
$$U(t) = U_{\infty} \left( 1 - e^{-\frac{t}{\tau_m}} \right) \quad \text{mit } \tau_m = RC \quad \mathbf{G4}$$

$$I(t) = C \cdot \frac{dU}{dt} = \frac{U_{\infty}}{R} \cdot e^{-\frac{t}{\tau_m}} \quad \mathbf{G5}$$

*Q*: Ladung;  $U_{\infty}$ : maximale Spannung am Kondensator;  $I(t)$ : kapazitiver Strom / Ladestrom;  $U(t)$ : Ladespannung;  
 $\tau_m$ : Zeitpunkt, an dem der Ladestrom auf  $1/e$  seines maximalen Wertes gefallen ist (RC-Zeit)

## Potentiale an einer Lipiddoppelschicht

Zu den physikalischen Eigenschaften der Membran zählt auch das Membranpotential. Hier müssen das Grenzflächenpotential, das Dipolpotential – zusammen das intrinsische Membranpotential – und das Transmembranpotential voneinander unterschieden werden. Jedes hat einen anderen Ursprung und ist in verschiedene biologische Prozesse involviert [20].



**Abbildung 3: Zeit-Abhängigkeit des Spannungs- und Stromverlaufs an einem Kondensator.** Dargestellt sind Ladespannung  $U(t)$  (blau) und Ladestrom  $I(t)$  (rot). Die dargestellte Zeit-Abhängigkeit gilt für einen Kondensator mit  $R_m$  bei konstantem Gleichstrom (Abbildung 2d) und einen Kondensator mit  $R_S$  bei Gleichspannung (Abbildung 2a). Bei einem Kondensator mit  $R_m$  bei Gleichstrom wird nach dem Abklingen des kapazitiven Stroms bzw. Ladestroms wie in der Abbildung angedeutet ein Ohm'scher Strom detektiert. Bei einem Kondensator mit  $R_S$  bei Gleichspannung geht der Ladestrom für große Zeiten gegen null.

### Das intrinsische Membranpotential

Die physikochemischen Eigenschaften der Lipidmembran sind für die Entstehung des intrinsischen Membranpotentials verantwortlich [21–23]. Da die Grenzflächenregion zwischen Wasser und Membran aufgrund der Lipidkopfgruppen stark geladen ist, kann eine Membran als geladene Wand mit dem Grenzflächenpotential  $\varphi_0$  (Gleichung G6) betrachtet werden [21]. Das Grenzflächenpotential ist aufgrund negativ geladener Kopfgruppen immer negativ gegenüber dem umgebenden Medium sowie negativ gegenüber dem Membraninneren und liegt im Bereich von -10 mV bis -100 mV [24]. Es ist abhängig von der Oberflächenladungsdichte und von der Ionenstärke im Medium und definiert den Potentialabfall sowie durch Coulomb-Wechselwirkungen den Verlauf der (Gegen- und Co-) Ionenkonzentrationen innerhalb der Wasserphase. Das Grenzflächenpotential führt zur Akkumulation von Ladungsträgern an der Membran-Wasser Grenzfläche. Insbesondere akkumulieren auch Protonen, eine Grundvoraussetzung für die Energiespeicherung in Form eines chemiosmotischen Potentials. Ein Freisetzen in die wässrige Umgebung würde zum Verlust des Potentials und damit zum Verlust der Energie führen [25].

Das Potential fällt von der Grenzfläche abhängig von der Ionenstärke bis zu einem Abstand von wenigen Nanometern bis auf null ab. Im Stern-Grahame Modell [26, 27] werden die Theorien nach

Helmholtz [28] sowie Gouy und Chapman [29, 30] kombiniert, um den Verlauf des Potentialabfalls möglichst genau zu beschreiben (Abbildung 4a). Bei kleinen Abständen zur Membran ist der Potentialverlauf linear. Die Kationen-Konzentrationen (Gegen-Ionen der negativ geladenen Lipidkopfgruppen) sind hoch. Die dehydratisierte innere Helmholtz-Schicht (IHS) und die hydratisierte äußere Helmholtz-Schicht (OHS) sind starr gebunden. Da diese Gegen-Ionen fest an die Lipidkopfgruppen gebunden sind, wird statt des Grenzflächenpotentials das experimentell zugängliche, effektive Zeta-Potential definiert, das die Gegen-Ionen mit einschließt und ungefähr dem Potential bei der OHS (Stern-Potential) entspricht [31]. Bei größeren Abständen zur Membran verläuft der Potentialabfall exponentiell mit dem Abstand (Gleichung G7), wie durch Gouy und Chapman beschrieben (GCS). Die totale Ionen-Konzentration ist wesentlich kleiner als bei niedrigen Abständen und weniger starr gebunden. Den verschiedenen Schichten des Potentialabfalls von der Membran-Wasser-Grenzfläche im Stern-Grahame Modell sind unterschiedliche Permittivitäten zugeordnet (Abbildung 4a).

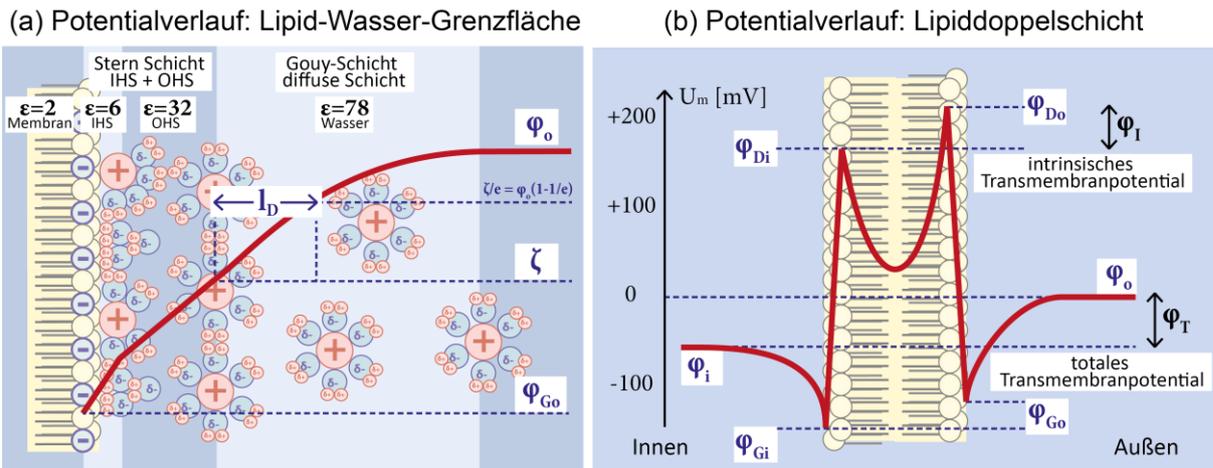
$$\varphi_0 = \frac{\sigma}{\varepsilon_r \varepsilon_0} \cdot l_D = \frac{\sigma}{F} \cdot \sqrt{\frac{RT}{2\varepsilon_r \varepsilon_0 J}} = K \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{J}} \quad \text{mit } J = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \quad \mathbf{G6}$$

$$\varphi(x) = \varphi_0 \cdot e^{-\frac{x}{l_D}} \quad \text{mit } l_D = \frac{1}{F} \cdot \sqrt{\frac{\varepsilon \varepsilon_0 RT}{J}} \quad \mathbf{G7}$$

$\varphi_0$ : Grenzflächenpotential;  $\sigma$ : Oberflächenladungsdichte;  $l_D$ : Debye Länge;  $F$ : Faraday-Konstante;  $R$ : ideale Gaskonstante;  
 $T$ : Temperatur;  $J$ : Ionenstärke;  $c$ : Ionenkonzentration;  $z$ : Ionenladung;  $\varphi(x)$ : Potentialverlauf nach Gouy Chapman;  
 $x$ : Abstand zur Membran

An der Grenzfläche zwischen Membran und wässrigem Medium, im Bereich der Lipidkopfgruppen resultiert aufgrund der vorhandenen Dipole ein großer Potentialsprung [12, 32–36]. Im Gegensatz zum Grenzflächenpotential, das die Ladungen an der Membran-Wasser-Grenzfläche berücksichtigt, gehen in das Dipolpotential die Elektronegativitäten und vorhandenen Dipole an der Grenzfläche ein, darunter die der Lipidkopfgruppen und orientierter Wassermoleküle. Der resultierende Potentialsprung ist positiv im Membraninneren und etwa 300 mV groß. Der Abfall des Dipolpotentials ist proportional zu  $1/x^2$  und damit signifikant schneller als der Abfall des Grenzflächenpotentials.

Die Beiträge der verschiedenen Potentiale zum Gesamtmembranpotential können in einen charakteristischen Kurvenverlauf zusammengefasst werden [13, 24, 37] (Abbildung 4b). Durch die Asymmetrie biologischer Membranen sind Grenzflächenpotentiale und Dipolpotentiale auf beiden Seiten der Membran unterschiedlich. Es ergibt sich ein intrinsisches Transmembranpotential. Zudem können die Potentiale in den wässrigen Lösungen auf beiden Seiten der Membran unterschiedlich sein, was zu einer weiteren Transmembranpotentialdifferenz führt (Seite 8, Gleichung G9).



**Abbildung 4: Potentialverlauf an und über einer Lipiddoppelschicht.**  $\phi_o/i$ : Potential in der äußeren/inneren wässrigen Lösung;  $\phi_{Do/Di}$ : Dipolpotential in der äußeren/inneren Membranhälfte;  $\phi_{Go/Gi}$ : Grenzflächenpotential in der äußeren/inneren Membranhälfte;  $\zeta$ : Zeta-Potential;  $\phi_i$ : Intrinsisches Transmembranpotential;  $\phi_T$ : Totales Transmembranpotential;  $l_D$ : Debye-Länge; (a): Potentialverlauf von der Membran-Wasser-Grenzfläche zur wässrigen Phase nach Stern-Grahame. In diesem Modell werden drei Schichten mit unterschiedlichen Permittivitäten berücksichtigt: Die Sternschicht setzt sich aus der Inneren (IHS) und Äußeren (OHS) Helmholtz-Schicht zusammen. Es folgt mit größerem Abstand zur Membran die Gouy-Schicht (GCS). Das Zeta-Potential im Bereich der OHS ist das experimentell bestimmbare Potential der Grenzfläche und wird durch Ladungsträger beeinflusst, die bei Bewegung der Grenzfläche mitgeführt werden. In der Sternschicht erfolgt der Potentialabfall linear. In der Gouy-Schicht erfolgt er exponentiell und wird durch die von der Ionendichte abhängigen Debye-Länge bestimmt. (b): Potentialverlauf über eine Lipiddoppelschicht. Mit zunehmendem Abstand zur Membran sinkt das Grenzflächenpotential ( $\sim 1/x$ ) langsamer als das Dipolpotential ( $\sim 1/x^2$ ). Der Potentialverlauf über die Membran zeigt: (1) das Grenzflächenpotential ist immer negativ gegenüber der jeweiligen wässrigen Umgebung, (2) das Grenzflächenpotential der inneren Membranhälfte ist durch einen Überschuss negativ geladener Lipide negativ gegenüber der äußeren, (3) das totale Transmembranpotential ist aufgrund von Anionen-Überschuss im Zytoplasma innen negativ gegenüber außen und wird maßgeblich durch eine Ungleichverteilung von Ionen auf beiden Seiten der Membran und weniger von der Asymmetrie der Grenzflächenpotentiale bestimmt und (4) im Inneren der Membran nehmen sowohl Dipolpotential als auch Grenzflächenpotential bis zur Membranmitte ab [13].

### Das transmembrane Membranpotential

Die selektive Permeabilität (Seite 10, Gleichungen G12 und G13) der Membran und ihre Kondensatoreigenschaften (Seite 2, Gleichung G1) ermöglichen den Aufbau eines transmembranen Membranpotentials. Die Ursache sind ungleichmäßig verteilte Ionenkonzentrationen auf beiden Seiten der Membran. So hat die asymmetrische Verteilung geladener Lipidkopfgruppen, also Unterschiede in den Grenzflächenpotentialen der beiden Membranhälften, kaum Einfluss auf das Transmembranpotential [24]. Es ist daher strikt vom intrinsischen Membranpotential zu unterscheiden. In *Abbildung 4b* ist ein Transmembranpotential durch eine Verschiebung der Potentiale in den wässrigen Lösungen ( $\phi_o > \phi_i$ ) dargestellt.

Die Plasmamembran aller lebenden Zellen besitzt ein natürliches Transmembranpotential, das sich von Organismus zu Organismus unterscheiden kann und von primär aktiven Transportern aufrechterhalten wird. Es variiert zwischen 20 mV und 200 mV und hat immer ein innen negatives Vorzeichen [24]. Seine zentrale biologische Bedeutung ist die Funktion als Triebkraft für sekundär aktiven Transport, wie ausführlicher auf *Seite 16f* betrachtet. Dabei konvertieren sekundär aktive Transporter die im Membranpotential gespeicherte Energie in einen Substrat-Gradienten und

fungieren somit als molekulare Maschinen. In biologischen Membranen kann das Transmembranpotential durch den Einbau gesteuerter Ionenkanäle zusätzlich reguliert werden, was die elektrische Signalweiterleitung in Neuronen ermöglicht.

Jede Ionen-Spezies besitzt ein elektrochemisches Potential  $\tilde{\mu}_i$  (Gleichung G8). Wenn auf beiden Seiten der Membran (i und ii) die Ionen-Spezies ungleichverteilt vorliegen, resultiert eine elektrochemische Potentialdifferenz  $\Delta\tilde{\mu}$  für die entsprechende Ionen-Spezies. Aufgrund der Differenz des elektrochemischen Potentials  $\Delta\tilde{\mu}$  resultiert ein Ionen-Fluss, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat, das vom Konzentrationsausgleich und vom Ladungsausgleich abweicht und durch die Nernst-Gleichung (Gleichung G9) beschrieben werden kann [38, 39]. Sie definiert das Membranpotential  $\Delta\varphi$ , wenn lediglich eine Ionen-Spezies membrangängig ist.

$$\tilde{\mu}_i = \mu_i + zF\varphi_i = \mu_0 + RT \ln c_i + zF\varphi_i \quad \text{G8}$$

$$\Delta\tilde{\mu} = \tilde{\mu}_i - \tilde{\mu}_{ii} \rightarrow \Delta\tilde{\mu} = \Delta\mu + zF\Delta\varphi = RT \ln \frac{c_i}{c_{ii}} + zF\Delta\varphi$$

$$\Delta\tilde{\mu} = 0 \rightarrow \Delta\varphi = -\frac{RT}{zF} \ln \frac{c_i}{c_{ii}} \quad \text{G9}$$

$\tilde{\mu}_i$ : elektrochemisches Potential;  $\mu_i$ : chemisches Potential;  $\mu_0$ : Standardpotential der Ionenspezies;  $\varphi_i$ : elektrisches Potential;  $\Delta\tilde{\mu}$ : Differenz der elektrochemischen Potentiale auf beiden Seiten der Membran;  
 $\Delta\varphi$ : Transmembranpotential im Gleichgewicht

Ist die Membran für mehrere Ionen-Spezies permeabel, müssen andere Modelle zur Berechnung des Membranpotentials herangezogen werden. Die Goldman Gleichung (Gleichung G10) stellt eine gute Näherung dar, in der die Beiträge der membrangängigen Ionen über ihre Permeabilitätskoeffizienten gewichtet sind [40, 41]. Ist bei gleicher Konzentration die Permeabilität eines Ions signifikant größer als die Permeabilitäten aller weiteren Ionen, so verschwinden die Beiträge der letzteren und das Goldman-Potential geht in das Nernst-Potential über.

$$\Delta\varphi = \varphi_i - \varphi_{ii} = \frac{RT}{F} \ln \frac{\sum P_K c_K^{ii} + \sum P_A c_A^i}{\sum P_K c_K^i + \sum P_A c_A^{ii}} \quad \text{G10}$$

$P$ : Permeabilitätskoeffizient; Index ii: periplasmatisch (außen); Index i: zytoplasmatisch (innen);  
Index A: Anion; Index K: Kation

## Die Membran als Barriere

Die Membran stellt eine Barriere für geladene und hydrophile Spezies da. Diese Eigenschaft erlaubt zusammen mit der Akkumulierung von Ladungsträgern aufgrund des Grenzflächenpotentials die Speicherung von Energie im chemiosmotischen Potential. Zudem können aufgrund der Barriere-

Eigenschaft verschiedene Kompartimente einer Zelle unterschiedliche Stoffwechselaktivitäten aufweisen. Membrantransporter versorgen die verschiedenen Kompartimente mit den benötigten Edukten.

### **Die Born-Bild-Energie**

Das intrinsische Membranpotential, bestimmt durch Grenzflächenpotential und Dipolpotential, stellt eine Energie-Barriere für Ladungsträger dar. Die größte Energie-Barriere resultiert jedoch aus der Änderung der Permittivität zwischen wässriger Phase und Membranphase. Für den Transfer eines Ions von einem Medium mit hoher Dielektrizitätskonstante in ein Medium mit niedriger Dielektrizitätskonstante muss Energie aufgewendet werden, um die Hydrathülle des Ions abzustreifen. Die Born-Energie  $W_B$  (Gleichung G11) beschreibt die entsprechend aufzuwendende Energie [33, 42–44].

$$W_B = \frac{q^2}{8\pi\epsilon_0 r} \cdot \left( \frac{1}{\epsilon_m} - \frac{1}{\epsilon_{H_2O}} \right) \text{ mit } q = ze \quad \text{G11}$$

$W_B$ : Born-Energie;  $r$ : Ionenradius;  $q$  Ionenladung;  $e$ : Elementarladung;  $\epsilon_m$ : Permittivität der Membran;  
 $\epsilon_{H_2O}$ : Permittivität von Wasser

Im Bereich der Grenzfläche ist das von einem Ladungsträger ausgehende, elektrische Feld nicht mehr durch ein Coulomb Potential zu beschreiben, weil die induzierten Ladungen im anderen Medium das ursprüngliche Feld stören. Das tatsächliche Potential an einem Punkt  $x$  innerhalb der Membran kann erhalten werden, wenn eine Bildpunktladung an dem Punkt  $-x$  in der wässrigen Umgebung angenommen wird. Dieser Bildpunktladungseffekt wurde von Neumecke und Läger zusammen mit der Born-Energie zur Born-Bild-Energie kombiniert [45]. Born- und Bildenergie nehmen sowohl für Kationen als auch Anionen bis zur Membranmitte stark zu und machen den größten Teil des Potentialsprungs für einen Ladungsträger aus, der sich über die Membran bewegt.

### **Selektive Permeabilität und Diffusionsfluss**

Der Permeabilitätskoeffizient  $P$  bestimmt den durch die Konzentrationsdifferenz einer ungeladenen Substanz getriebenen Diffusionsfluss  $J$  über die Membran (Gleichung G12). Diese Beziehung ergibt sich intuitiv aus dem ersten Fick'schen Gesetz [46]. Ist die Substanz geladen, so geht das elektrische Potential mit in den Diffusionsfluss ein und es ergibt sich die Nernst-Planck-Gleichung (Gleichung G13) [38, 39, 47, 48].

Hydrophobe Substanzen haben hohe Permeabilitätskoeffizienten von bis zu  $1 \text{ cm}^2/\text{s}$  und sind leicht membrangängig (Gleichung G14) [49, 50], während Ionen mit hoher Ladungsdichte sehr niedrige Permeabilitätskoeffizienten aufweisen. So hat beispielsweise Kalium eine Permeabilität von  $10^{-12} \text{ cm}^2/\text{s}$  [51]. Die Permeabilitäten von lipidlöslichen Verbindungen sind der Overton-Regel gemäß

proportional zum Verteilungskoeffizienten  $\gamma$  zwischen Membran und Wasser [52–55]. Ihre Löslichkeit im hydrophoben Kern der Membran ermöglicht es die Membran durch einfache Diffusion zu passieren.

$$J = -D \frac{dc}{dx} \rightarrow J = P \cdot \Delta c \quad (\text{ungeladene Spezies}) \quad \mathbf{G12}$$

$$J = D \cdot \left( \frac{dc}{dx} + \frac{zFc}{RT} \cdot \frac{d\varphi}{dx} \right) \quad (\text{geladene Spezies}) \quad \mathbf{G13}$$

$$P = \gamma \cdot \frac{D}{d} \quad \text{mit } \gamma = c_m/c_w \quad \mathbf{G14}$$

*J: Diffusionsfluss; D: Diffusionskoeffizient; P: Permeabilitätskoeffizient; c: Konzentration;  $\varphi$ : elektrisches Potential;  
 $\gamma$ : Verteilungskoeffizient; d: Membrandicke;  $c_m$ : Konzentration innerhalb der Membran;  
 $c_w$ : Konzentration im wässrigen Medium*

Die Permeabilität hydrophiler und geladener Spezies hingegen lässt sich nicht gemäß der Overton-Regel erklären. Der zugrunde liegende Mechanismus für die Diffusion geladener Substanzen unterscheidet sich daher maßgeblich von der Diffusion hydrophober Substanzen. So befinden sich selbst in kleinen Vesikeln 30-40 Wassermoleküle gelöst innerhalb der hydrophoben Lipidschicht [56]. Die Diffusion geladener Substanzen könnte daher durch transiente transmembrane Verkettungen aus Wassermolekülen erfolgen, die sich aufgrund thermischer Dichtefluktuationen bilden [57, 58]. Entlang von H<sub>2</sub>O-Ketten können Protonen mittels Grotthuß-Mechanismus [59, 60] sehr schnell die Membran passieren. So ergeben sich in biologischen Membranen für Wasser Permeabilitätskoeffizienten im Bereich von 10<sup>-3</sup> cm/s und Protonen im Bereich von 10<sup>-4</sup> cm/s [57]. Aber auch andere Ionen und kleine Moleküle sind in der Lage die Membran über Wasserporen in ihrer hydratisierten Form zu überqueren, jedoch mit wesentlich geringeren Raten als Protonen [61]. Aufgrund der hohen Energiebarriere für Ionen (Seite 9, Gleichung G11) ist der Anteil, der durch einfache Diffusion das hydrophobe Membraninnere passiert, wahrscheinlich gering. Es ist jedoch hinzuzufügen, dass unter bestimmten Bedingungen auch wesentlich niedrigere Permeabilitäten für Protonen bestimmt werden können [62].

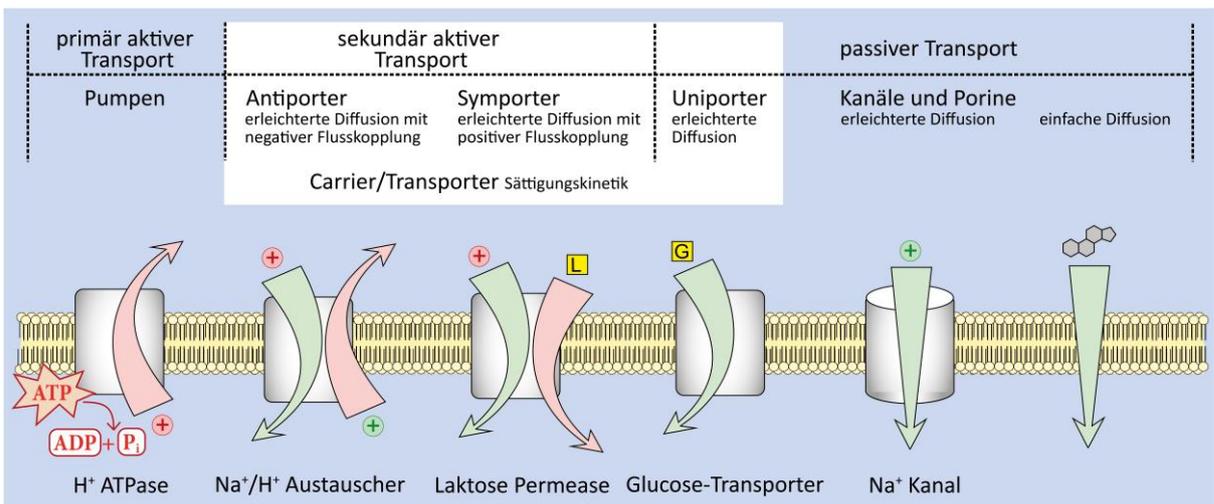
## Transport über Membranen

Alleine im menschlichen Genom codieren über 800 Gene für Transportproteine [63]. Durch die hohe Spezifität für ihre Substrate stellen sie die erste Ebene der Regulation zwischen Organismus und Umwelt dar. Daher verwundert nicht, dass viele dieser Transportproteine mit schweren Erkrankungen assoziiert sind, darunter Alzheimer, Krebs und psychische Störungen wie Autismus oder die Neigung zu Depressionen [64]. An den grundlegenden Mechanismen des Membrantransports wird daher intensiv geforscht.

## Grundlegende Prinzipien des Membrantransports

Auf Basis der Energiequelle lassen sich drei Transporter-Klassen unterscheiden: passive Transporter, primär aktive Transporter und sekundär aktive Transporter [65] (Abbildung 5). Passive Transporter reduzieren die Energiebarriere des hydrophoben Membraninneren für geladene und polare Substanzen aufgrund einer Erhöhung der Permittivität [42], sodass der Transfer vom wässrigen Medium durch die Lipidphase erleichtert ist. Sie katalysieren damit erleichterte Diffusion ohne Energie zu benötigen. Aktive Transporter hingegen katalysieren unter Energieverbrauch den Transport von Substanzen entgegen ihres elektrochemischen Gradienten.

Bezüglich des Transportmechanismus können Transporter weiter klassifiziert werden. Pumpen katalysieren den primär aktiven, unidirektionalen Transport entgegen des elektrochemischen Gradienten unter Energieverbrauch durch ATP-Hydrolyse oder Photonen-Absorption. So generieren sie ein elektrochemisches Potential über der Membran, das unter anderem von sekundär aktiven Transportern ausgenutzt werden kann. Kanäle sind passive Transporter und ermöglichen durch selektive Poren innerhalb der Membran eine erleichterte Diffusion bestimmter Ionen-Spezies und eine sehr hohe Transportrate von meist über  $10^6 \text{ s}^{-1}$ . Die Transportrichtung und Geschwindigkeit ist abhängig vom elektrochemischen Gradienten für die Ionen-Spezies und die Regulation betrifft ausschließlich das Öffnen und Schließen der Pore (*gating*). Neben den Pumpen und Kanälen stellen die Carrier eine wichtige Transporter-Klasse dar.



**Abbildung 5: Übersicht der verschiedenen Transporter-Klassen und Einordnung des Carrier-vermittelten Transports.** Für jede Transporter-Klasse ist ein typisches Beispiel dargestellt. Transportprozesse entlang des elektrochemischen Gradienten sind mit grünen Pfeilen, solche entgegen des elektrochemischen Gradienten mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Der weiße Kasten umrahmt die drei Carrier-Klassen: Antiporter und Symporter sind sekundär aktive Transporter, während Uniporter passive Transporter darstellen.

### ***Alternating Access als Mechanismus für Carrier-vermittelten Transport***

Carrier nehmen eine Sonderstellung ein: Sie können sowohl passiven als auch sekundär aktiven Transport katalysieren. Im Gegensatz zu Kanälen besitzen sie definierte Bindestellen für ihre Substrate, was die Kopplung der Flüsse zweier Substrate ermöglicht. So kann der Transport eines Substrats entlang seines elektrochemischen Gradienten den Transport eines anderen Substrats entgegen seines elektrochemischen Gradienten treiben.

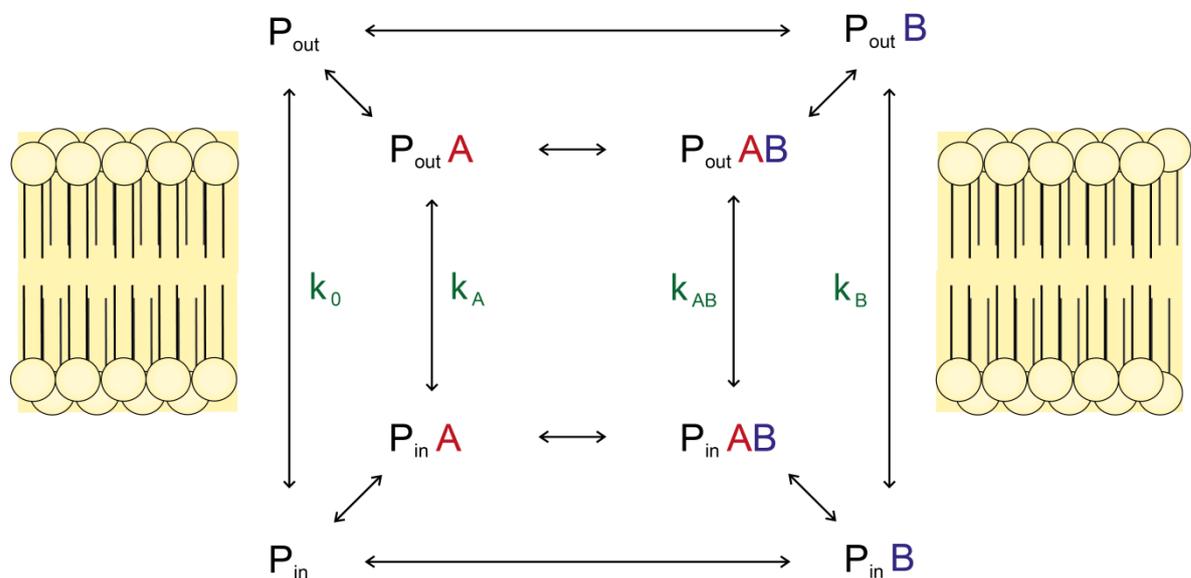
Prinzipiell könnte der Carrier-vermittelte Transport durch zwei Mechanismen beschrieben werden. Das Substrat könnte entlang eines Substrattranslokationsweges innerhalb des Transporters von Bindestelle zu Bindestelle über die Membran befördert werden. Mit Ausnahme der spezifischen Bindestellen entspräche die Struktur der eines Kanals oder Porins (siehe [oben](#)). Ein solcher Mechanismus ist beispielsweise für den  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -Antiporter CIC beschrieben [\[66\]](#). Eine zweite Möglichkeit ist die Existenz von nur einer Bindestelle, die abwechselnd von beiden Seiten der Membran zugänglich gemacht wird. Letzteres ist ein Modell, das unter der Bezeichnung *Alternating Access* bereits seit 1966 bekannt ist [\[67\]](#) und für eine Vielzahl von Carriern angenommen wird [\[68–70\]](#).

Im *Alternating Access* wird immer eine einwärtsgerichtete von einer auswärtsgerichteten Konformation unterschieden. Bindung und Dissoziation des Substrats sind in beiden Konformationen getrieben durch die intrazelluläre bzw. extrazelluläre Substratkonzentration. Ist die extrazelluläre Substratkonzentration viel größer als die Bindungskonstante, welche die Affinität des Transporters beschreibt, sind die Bindestellen dort gesättigt. Wenn zugleich die intrazelluläre Konzentration null ist, sodass das Gleichgewicht auf der Seite der Substratdissoziation liegt, erfolgt der Influx mit einer maximalen Rate. Eine charakteristische Eigenschaft des Carrier-vermittelten Transports ist daher seine Sättigungskinetik. Die Transportrate nimmt hyperbolisch mit steigender Substratkonzentration zu.

Auf Basis struktureller Unterschiede wird zwischen translatorischen Carriern und Permeasen unterschieden. Translatorische Carrier diffundieren innerhalb der Membran zwischen den beiden Grenzflächen und ermöglichen relativ hohe Transportraten in der Größenordnung von etwa  $10^4 \text{ s}^{-1}$  [\[71, 72\]](#). Beispiele sind die elektroneutralen Carrier Monensin und Nigericin sowie die elektrogenen Carrier Valinomycin und CCCP (Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon). Permeasen exponieren die Bindestellen abwechselnd auf unterschiedlichen Seiten der Membran, indem sie große Konformationsänderungen durchlaufen. Damit verbunden sind niedrigere Transportraten in der Größenordnung von etwa  $10 \text{ s}^{-1}$  [\[73\]](#).

### Carrier-vermittelter Transport und Flusskopplung

Carrier können Uniporter, Symporter und Antiporter darstellen, welche Substrate mittels passiver erleichterter Diffusion oder sekundär aktivem Cotransport über die Membran transportieren. Sie sind aufgrund unterschiedlicher Flusskopplungsmechanismen dazu in der Lage den Cotransport mehrerer Substrate zu katalysieren [9, 74]. Die Transportrichtung wird in allen Fällen vom elektrochemischen Gradienten der beteiligten Substrate definiert. Sind die Substrate auf beiden Seiten der Membran gleichverteilt, findet kein Netto-Transport, aber ein passiver Substrat-Austausch statt. Das 8-Zustands-Modell mit vier möglichen Konformationsänderungen ist ein minimales kinetisches Modell, das alle Carrier-Transportmoden beschreibt [75] (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Minimales kinetisches Modell für Carrier-vermittelte, gekoppelte Transportmoden.** Der Carrier P existiert in der einwärtsgerichteten ( $P_{in}$ ) und der auswärtsgerichteten ( $P_{out}$ ) Konformation und kann die Substrate A sowie B binden. In einem Symporter dominieren aufgrund positiv kooperativer Bindung die Zustände P und PAB. In einem Antiporter dominieren aufgrund kompetitiver Bindung die Zustände PA und PB. Die Verhältnisse der Ratenkonstanten  $k_0$ ,  $k_A$ ,  $k_B$  und  $k_{AB}$  für die einzelnen Konformationsänderungen sind für Symporter und Antiporter unterschiedlich. Ein Symporter hat hohe Ratenkonstanten für die Konformationsänderungen in den Zuständen P und PAB und gleichzeitig kleine Ratenkonstanten für die Konformationsänderungen in den Zuständen PA und PB (entkoppelte Translokation). Für einen Antiporter verhält es sich genau entgegengesetzt.

Die Flusskopplung wird durch intrinsische Transporter-Eigenschaften wie Energiebarrieren für die Konformationsänderungen zwischen einwärtsgerichteten und auswärtsgerichteten Zuständen oder Kooperativität bzw. Kompetitivität der Substratbindung gewährleistet. Sie beeinflussen die Geschwindigkeit einzelner Teilreaktionen im 8-Zustands-Modell und begünstigen damit unter definierten äußeren Bedingungen entweder den Symport oder den Antiport der Substrate.

Ein idealer Symporter würde für seine zwei Substrate unterschiedliche Bindestellen aufweisen, wobei die Bindung des einen Substrats (A) die Bindung des zweiten Substrats (B) begünstigt (kooperative Bindung). Damit liegen die Transporter (P) vermehrt in den Zuständen PAB oder P vor. Zugleich wäre

die Energiebarriere für die Konformationsänderung zwischen einwärts- und auswärtsgerichteter Konformation nur im vollständig beladenen (PAB) und unbeladenen (P) Zustand minimal, während die Konformationsänderung des Carriers in den Zuständen PA und PB aufgrund einer hohen Energiebarriere verhindert wird. Unter diesen Voraussetzungen erfolgt eine positive Flusskopplung: Beide Substrate werden in dieselbe Richtung transportiert, wobei der elektrochemische Gradient des einen Substrats den Transport des anderen Substrats entgegen seines Konzentrationsgradienten treibt. Ein ähnlicher Mechanismus ist beispielsweise für den Peptid/H<sup>+</sup>-Symporter POT beschrieben [76].

Ein idealer Antiporter hat nur eine Bindestelle für seine zwei Substrate, sodass die Substrate miteinander um die Bindestelle konkurrieren (kompetitive Bindung). Der Zustand PAB existiert nicht. Der Transporter liegt entweder im Zustand PA oder im Zustand PB vor. Außerdem wäre die Energiebarriere für die Konformationsänderung zwischen einwärts- und auswärtsgerichteter Konformation im unbeladenen Zustand (P) sehr hoch, sodass die Konformationsänderung des leeren Carriers nicht stattfindet. Unter diesen Voraussetzungen erfolgt eine negative Flusskopplung: Beide Substrate werden in entgegengesetzte Richtung transportiert. Nach diesem Prinzip erfolgt beispielsweise der Transport im Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter NhaA [77, 78].

Uniporter katalysieren den Transport eines einzelnen Substrats entlang seines Konzentrationsgradienten. Es handelt sich im Gegensatz zum Symport und Antiport um erleichterte Diffusion, also um einen passiven Transportmodus. Uniporter können als Unterart der Carrier betrachtet werden, denen Mechanismen zur Flusskopplung mit einem Cosubstrat fehlen.

### ***Vom idealen zum realen Cotransporter: Substratgradienten diktieren den Transportmodus***

Für die Flusskopplung *idealer* Symporter und Antiporter gelten genau entgegengesetzte Bedingungen (siehe *oben*). Ein Symporter muss die Bindung der Substrate miteinander koppeln und die Konformationsänderung im leeren Carrier mit einer hohen Ratenkonstante erlauben, während ein Antiporter eine kompetitive Bindung der Substrate verlangt und die entsprechende Konformationsänderung verhindern muss. Unter *realen* Bedingungen ist die Kooperativität der Bindung sehr unwahrscheinlich ausschlaggebend für die Bestimmung des Transportmodus. Zudem haben alle Konformationsänderungen bei Uniportern, Symportern und Antiportern wahrscheinlich endliche, wenn auch stark unterschiedliche Ratenkonstanten (*Abbildung 6*). Die Betrachtung von realen Symportern und Antiportern macht deutlich, dass keine scharfen Grenzen zwischen Symporter, Antiporter und Uniporter existieren.

Neben den erwähnten intrinsischen Transporter-Eigenschaften haben vor allem die äußeren Bedingungen, also Substratgradienten und Membranpotential einen großen Einfluss auf die

tatsächlichen effektiven Raten der Teilreaktionen im Transportzyklus und können damit theoretisch den Transportmodus beeinflussen. Eine hohe Substratkonzentration  $c_{out}A$  erhöht beispielsweise die Population des beladenen Carriers  $P_{out}A$  und damit die effektive Rate der Konformationsänderung vom auswärtsgerichteten in den einwärtsgerichteten Zustand. Entgegengesetzte Substratgradienten begünstigen damit den Antiport-Modus, während gleichgerichtete Substratgradienten den Symport-Modus fördern (*Tabelle 1*). Das Membranpotential hingegen beschleunigt bzw. verlangsamt je nach Richtung der Ladungsverschiebung die effektive Rate aller elektrogenen Konformationsänderungen und kann somit ebenfalls Einfluss auf den Transport-Modus nehmen.

**Tabelle 1: Konsequenzen unterschiedlicher Substratgradienten auf den Transportmodus im 8-Zustands-Modell.** Das 8-Zustands-Modell ist in *Abbildung 6* dargestellt. Neben den intrinsischen Transporter-Eigenschaften können die Umweltbedingungen wie die vorliegenden Substratgradienten den Transportmodus beeinflussen. Hier wird ein hypothetischer Transporter mit zwei Bindestellen betrachtet. Für die Konformationsänderung des leeren Carriers wird eine durchschnittliche Ratenkonstante angenommen.

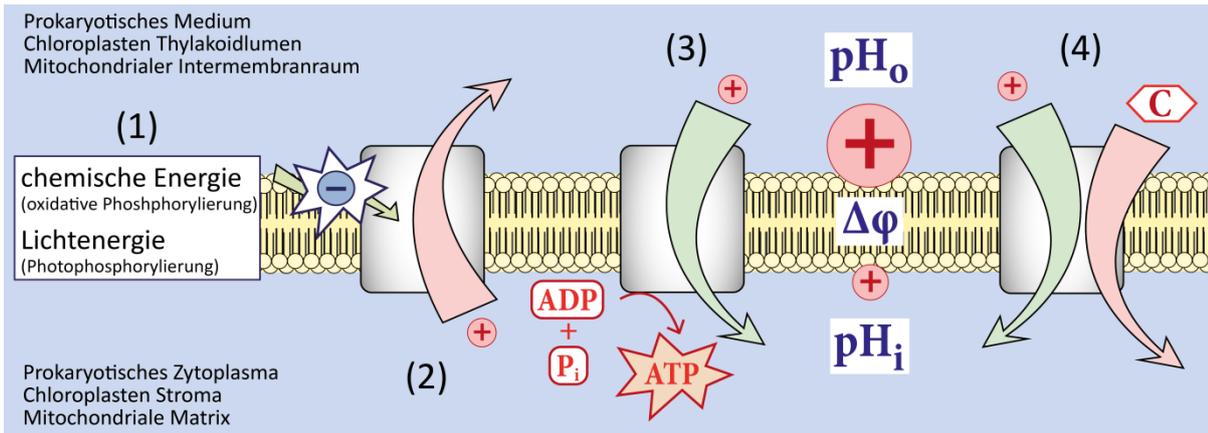
Substratgradienten		Transportmodus	Transporter-Gradienten	Einfluss auf Konformationsänderungen
Gleichgerichtet	$c_{out}A > c_{in}A$	Symport (Bdg. kooperativ)	$cP_{out}AB > cP_{in}AB$	$P_{out}AB \rightarrow P_{in}AB$ dominiert
	$c_{out}B > c_{in}B$	Uniport (Bdg. kompetitiv)	$cP_{out}A > cP_{in}A$ $cP_{out}B > cP_{in}B$	$P_{out}A \rightarrow P_{in}A$ dominiert $P_{out}B \rightarrow P_{in}B$ dominiert
Entgegengerichtet	$c_{out}A > c_{in}A$	Antiport	$cP_{out}A > cP_{in}A$	$P_{out}A \rightarrow P_{in}A$ dominiert
	$c_{out}B < c_{in}B$		$cP_{out}B < cP_{in}B$	$P_{in}B \rightarrow P_{out}B$ dominiert

Während die intrinsischen Eigenschaften des Carriers oftmals darauf ausgelegt sind, dass ein Carrier entweder Symport oder Antiport katalysiert, können die Substratgradienten und ein ggf. anliegendes Membranpotential entgegengesetzte Konsequenzen haben. Dass Symporter und Antiporter aufgrund nichtperfekter Kopplung Uniport katalysieren können, wenn sie einem hohen Konzentrationsgradienten ausgesetzt sind, ist in der Literatur beschrieben [79]. So zeigen auch Mutanten des  $H^+$ /Lactose-Symporters LacY, die nicht zur Protonentranslokation fähig sind, einen Zucker-Uniport [80]. Auch für den Protonen-gekoppelten Antiporter EmrE werden entkoppelte Transportmoden vermutet [77, 81, 82]. Problematisch ist hier, dass eine experimentelle Überprüfung nichtperfekter Kopplung kaum möglich ist.

Sehr wahrscheinlich haben sich die Ratenkonstanten der einzelnen Konformationsänderungen im Verlauf der Evolution soweit angepasst, dass unter den Bedingungen *in vivo* der entsprechend benötigte Transport-Modus dominiert. Unter experimentellen Bedingungen könnten jedoch Bedingungen erzeugt werden, bei denen die Substratgradienten und das Membranpotential die effektiven Raten der Konformationsänderungen so beeinflussen, dass auch ein Symporter befähigt wird Antiport zu katalysieren und umgekehrt.

**Die Bedeutung von  $\Delta pH$  und  $\Delta\phi$  für PMF-gekoppelte Carrier**

Die Triebkraft für elektrogenen passiven oder sekundär aktiven Carrier vermittelten Transport wird durch die Differenz des elektrochemischen Potentials  $\Delta\tilde{\mu}$  des transportierenden Ions bestimmt (Seite 8, Gleichung G8). Viele sekundär aktive Transporter sind an den über biologische Membranen anliegenden Protonengradienten gekoppelt, so auch die Zucker-Transporter, welche in der vorliegenden Arbeit charakterisiert werden. *In vivo* wird dieser Protonengradient über primär aktiven Transport aufrechterhalten (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Energiekopplung an einer biologischen Membran:** (1) Organismen nehmen Energie in Form von chemischer Energie oder Lichtenergie auf. (2) Die chemische Energie wird teilweise über Reduktionsäquivalente und der Elektronentransportkette während der oxidativen Phosphorylierung in einen Protonen-Gradienten umgewandelt. Lichtenergie kann direkt durch Photonen-gesteuerte Pumpen wie Bakteriorhodopsin in einen Protonen-Gradienten umgewandelt werden. (3) Der Protonengradient wird zur Synthese von ATP sowie (4) für den Transport von Substanzen wie Kohlenstoffquellen (symbolisiert durch das C) entgegen ihres elektrochemischen Gradienten verwendet, um die Stoffwechselaktivitäten der Zelle aufrecht erhalten zu können.

Die protonenmotorische Kraft (PMF) nach der chemiosmotischen Hypothese von Peter Mitchell [83, 84], also die Triebkraft  $\Delta p$  für die Protonen-Translokation lässt sich auf Basis des elektrochemischen Potentials ableiten (Gleichungen G15 und G16).

$$\Delta\mu_{H^+} = RT\Delta pH - F\Delta\phi \quad [J/mol] \quad \text{G15}$$

$$\text{mit } \Delta pH = -\ln \frac{c_i}{c_{ii}}, \quad \Delta\phi = \phi_i - \phi_{ii}$$

$$\Delta p = \frac{RT}{F}\Delta pH - \Delta\phi = (59 \text{ mV})\Delta pH - \Delta\phi \quad [mV] \quad \text{G16}$$

Mit der Ausnahme von alkalophilen Mikroorganismen hat das Zytoplasma meist einen basischeren pH-Wert und ist negativer geladen als die extrazelluläre Flüssigkeit [85]. PMF-gekoppelter sekundär aktiver Transport kann also *in vivo* durch  $\Delta\phi$  oder  $\Delta pH$  getrieben werden. Dabei sind  $\Delta\phi$  und  $59 \text{ mV} \cdot \Delta pH$  thermodynamisch äquivalent. Beides beeinflusst damit die Fähigkeit des Transporters das Substrat innerhalb der Zelle zu akkumulieren (Gleichung G17). Verallgemeinert ergibt sich für  $\Delta p$  von  $59 \text{ mV}$  eine zehnfache Akkumulierung des Substrats, für  $118 \text{ mV}$  eine hundertfache

Akkumulierung. Für den H<sup>+</sup>/Lactose-Symporter LacY ergibt sich alleine durch das in *E.coli* anliegende Membranpotential von -130 mV eine Akkumulierung von Lactose um einen Faktor von etwa 160. Bei saurem pH-Wert außen wird dieser Faktor weiter erhöht, im basischen reduziert.

$$\frac{[\text{Lactose}]_i}{[\text{Lactose}]_o} = \left( \frac{10^{-\text{pH}_o}}{10^{-\text{pH}_i}} \right) \cdot e^{-\left(\frac{F}{RT} \Delta\varphi\right)} \quad \text{G17}$$

*in vivo* mit  $\Delta\varphi = -130 \text{ mV}$  und  $\text{pH}_i = 7,6$

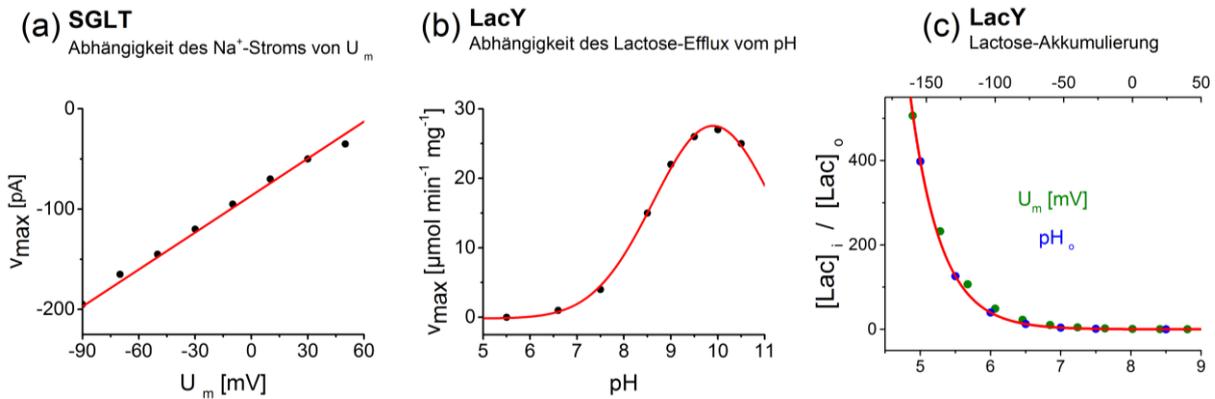
Die beiden Komponenten von  $\Delta\mu$  können sich jedoch erheblich in ihren kinetischen Effekten unterscheiden. Wenn  $\Delta\text{pH}$  die alleinige Triebkraft darstellt, wird die Transportrate (bei konstantem intrazellulärem pH-Wert) mit der extrazellulären Protonenkonzentration solange erhöht, bis die extrazelluläre Protonenbindestelle gesättigt ist. Eine solche Sättigung tritt nicht auf, wenn  $\Delta\varphi$  die Triebkraft darstellt, solange nicht eine andere, Potential-unabhängige Reaktion im Transportzyklus ratenlimitierend wird. Aus diesem Grund ist  $\Delta\varphi$  kinetisch eine effizientere Triebkraft als  $\Delta\text{pH}$ .

Wie genau beeinflussen  $\Delta\text{pH}$  und  $\Delta\varphi$  die Transportrate in PMF-gekoppelten Carriern? Ein Carrier vermittelter Transport besteht immer aus einer Reaktionsfolge, wie z.B. im 8-Zustands-Modell beschrieben ([Seite 13, Abbildung 6](#)). Handelt es sich um einen Cotransport mit Protonen, so sind die effektiven Raten sowohl der Protonenbindung als auch der Protonenfreisetzung pH-abhängig, während die Ladungs-transferierende Reaktion, z.B. die Konformationsänderung im Zuge des *Alternating Access*  $\Delta\varphi$ -abhängig ist. Welche Auswirkungen pH-Werte und Membranpotential auf die Transportrate haben, ist abhängig davon welche Reaktion ratenlimitierend ist.

- Häufig ergibt sich eine lineare Abhängigkeit vom Potential ([Abbildung 8a](#)). Je größer die Steigung, desto elektrogener die Potential-abhängige Reaktion. Die Kurve kann bei hohen oder niedrigen Potentialen abflachen, wenn bei hohen oder niedrigen Potentialen eine andere Reaktion ratenlimitierend wird.
- Für die pH-Abhängigkeit werden häufig Glockenkurven gefunden ([Abbildung 8b](#)). Hierfür gibt es verschiedene Gründe. Im Allgemeinen haben Proteinaktivitäten spezifische pH-Optima. Bei Transportern könnte eine langsamere Protonenbindung im Basischen (Protonenmangel) die Umsatzrate reduzieren, während im Sauren (Protonenüberschuss) eine langsamere Protonenfreisetzung die Umsatzrate reduziert.

In [Abbildung 8](#) sind typische Abhängigkeiten der Transportrate elektrogener Symporter von Potential und pH-Wert dargestellt. So zeigt die Transportrate des humanen Natrium-Glucose Cotransporters SGLT1 eine lineare Abhängigkeit von der angelegten Spannung mit einem Umkehrpotential von > 50 mV [[86, 87](#)]. Dies zeigt, dass die elektrogene Reaktion ratenlimitierend für alle angelegten Spannungen ist. Für die pH-Abhängigkeit des Protonen-Lactose Symporters LacY ( $\Delta\varphi = 0 \text{ mV}$ ) wurde

eine Glockenkurve gefunden, mit einem pH-Optimum im basischen pH-Bereich [88, 89]. Bei pH-Werten unterhalb des pH-Optimums wurde daher die Protonenfreisetzung als ratenlimitierende Reaktion aufgefasst.



**Abbildung 8: Einfluss von Membranpotential und pH-Wert auf die Umsatzrate PMF-gekoppelter Transporter.** Experimentell bestimmte Abhängigkeiten der *steady-state* Umsatzraten von (a) SGLT2 [86] und (b) LacY [89] vom Membranpotential bzw. pH-Wert. (c) Theoretisch berechnete Abhängigkeit des Faktors der Lactose-Akkumulierung vom äußeren pH-Wert ( $\text{pH}_o$ , blaue Datenpunkte; hier ist  $U_m = 0 \text{ mV}$ ,  $\text{pH}_i = 7,6$ ) bzw. dem Membranpotential ( $U_m$ , grüne Datenpunkte; hier ist  $\text{pH}_i = \text{pH}_o = 7,6$ ). In rot ist die Anpassung der Datenpunkte mittels monoexponentieller Funktion dargestellt (Seite 17, Gleichung G17).

Es ist wichtig festzuhalten, dass  $\Delta\text{pH}$  und  $\Delta\phi$  sich gegenseitig beeinflussen [90]. Im Experiment an Modellmembranen kann ein elektrisches Potential  $\Delta\phi$  angelegt werden. Dann fungiert  $\Delta\phi$  als Triebkraft, wodurch das Membranpotential in einen entgegengesetzt gerichteten Konzentrationsgradienten umgewandelt wird. Alternativ können durch Lösungswechsel pH-Sprünge erfolgen. Hier fungiert  $\Delta\text{pH}$  als Triebkraft und es wird ein Membranpotential aufgebaut. Wenn die Triebkraft nicht konstant gehalten wird, so z.B. in einem kapazitiv gekoppelten Messsystem, wie es in der vorliegenden Arbeit verwendet wird (Seite 33, Abbildung 12), sind die Transportvorgänge nicht stationär. Rückschlüsse auf den *steady-state* können nur für den Zeitpunkt  $t = 0$  gezogen werden. Die Transportrate wird mit der Zeit langsamer, weil sich ein Transmembranpotential aufbaut. Die Protonen-Konzentration ändert sich im Messzeitraum nicht signifikant. Der Grund ist die Pufferkapazität, wodurch sich ein Potential von 59 mV um zwei bis drei Größenordnungen schneller aufbaut als der entsprechende chemische Gradient ( $\Delta\text{pH} = 1$ ) [91].

### Zucker-Transporter der *major facilitator superfamily* (MFS)

Bisher wurden über einhundert Transporter-Familien beschrieben [92, 93]. Proteine der primär aktiven ABC-Superfamilie [94–96] und der sekundär aktiven *major facilitator superfamily* (MFS) [97–99] machen über die Hälfte der in Mikroorganismen exprimierten Transporter aus. Und sie kommen ubiquitär in allen Organismen vom Archaeon bis hin zum Säuger vor.

Transporter der MFS transportieren eine Vielzahl kleiner, löslicher Moleküle unter Ausnutzung des chemiosmotischen Potentials. Darunter Aminosäuren, Peptide, Intermediate des Citratzyklus, Polyalkohole, Zucker, Neurotransmitter, Antibiotika, Osmolyte, Siderophore sowie organische und anorganische Anionen. Zur MFS gehören über 15.000 sequenzierte und evolutionär verwandte Mitglieder, darunter Uniporter, Symporter und Antiporter [100, 101]. Obwohl Mitglieder der MFS mit einer Sequenz-Identität zwischen 12 % und 18 % nur geringe Sequenzähnlichkeiten aufweisen [102], zeigen alle eine ähnliche dreidimensionale Struktur, den *core-MFS-fold* [97], bestehend aus zwei Domänen, welche die Substratbindestellen im Zentrum des Proteins umgeben. Diese sind über wassergefüllte Kavitäten abwechselnd von der einen Seite oder der anderen Seite der Membran zugänglich.

### ***Phylogenetische Einordnung***

Kohlenhydrate oder Zucker sind die häufigste Kohlenstoff- und Energiequelle für Pro- und Eukaryoten und damit die quantitativ wichtigste organische Verbindung, die von lebenden Organismen aufgenommen wird [103, 104]. Bisher bekannte Zuckertransporter können drei verschiedenen Superfamilien zugeordnet werden [105, 106]: SWEETs [107], Natrium-Glucose Symporter (SGLTs) [108, 109] und Transporter der MFS [110], zu denen auch die humanen Glucose-Transporter (GLUTs) [111, 112] und der prototypische *E.coli* Transporter LacY [113] gehören. Hinzu kommt der Spezialfall des bakteriellen Phosphotransferase-Systems (PTS) [114, 115]. In der vorliegenden Arbeit sollen die Transport-Eigenschaften von LacY mit denen anderer bakterieller Zucker-Transporter der MFS (FucP, XylE und GlcP) gegenübergestellt werden, um grundlegende Prinzipien und Unterschiede zwischen den Transportern zu identifizieren.

Seinen Anfang nahm alles bei *lacY*, eines von drei Genen des *lac*-Operons in *Escherichia coli*, das bereits in den 1950er Jahren entdeckt wurde [116–118] und den PMF-gekoppelten Symport von D-Lactose und anderen  $\beta$ -Galactosiden katalysiert. Es war der erste Transporter, für den PMF-gekoppelter Symport gezeigt werden konnte [119]. Es handelt sich auch um das erste Gen eines Membranproteins, das kloniert [120], sequenziert [121] sowie exprimiert und gereinigt [122] wurde. Im Jahr 1980 konnte die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. H. Ron Kaback die Protonengradienten-abhängige Transportaktivität in isolierten Membranvesikeln demonstrieren [123], woraufhin mit die bedeutendsten Erkenntnisse über Struktur und Funktion von LacY durch die Gruppe um Kaback folgten und bis heute folgen [113, 124, 125].

XylE und GlcP gehören zusammen mit den GLUTs der *Sugar-Porter* Familie an, während LacY und FucP unterschiedlichen Familien zugeordnet werden (Tabelle 2) [126]. XylE und GlcP können daher als Modellproteine für GLUT-vermittelten Transport betrachtet werden. XylE und GLUT1-4 zeigen 30 % Sequenz-Identität und etwa 50 % Sequenzähnlichkeit. Die GLUTs zählen nicht zuletzt wegen

ihrer Relevanz für den Menschen zu den mit am intensivsten studierten Mitgliedern der MFS Zucker-Transporter. Dabei handelt es sich um Uniporter, die möglicherweise im Laufe der Evolution die Fähigkeit zum Cotransport verloren haben, weil der natürliche Glucose-Konzentrationsgradient im Darm ausreichende Triebkraft für den Transport darstellt [127]. Die Bedeutung der GLUTs in der Physiologie des Menschen macht insbesondere hinsichtlich der Entwicklung neuer Medikamente deutlich wie wichtig ein detailliertes Verständnis von Struktur und Funktion dieser Transporter-Klasse ist.

**Tabelle 2: Klassifizierung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Membrantransporter der major facilitator superfamily nach Klassifikationssystemen der TCDB und Pfam.** Zu Vergleichszwecken wurden GLUT1 und MelB ergänzt.

Transporter	Organismus	TCDB Subfamilie	Pfam Familie
GLUT1	<i>Homo Sapiens</i>	Sugar Porter (SP) (2.A.1.1)	Sugar tr (PF00083)
Xyle	<i>Escherichia coli</i>	Sugar Porter (SP) (2.A.1.1)	Sugar tr (PF00083)
GlcP	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Sugar Porter (SP) (2.A.1.1)	Sugar tr (PF00083)
FucP	<i>Escherichia coli</i>	Fucose:H <sup>+</sup> Symporter (FHS) (2.A.1.7)	MFS 1 (PF07690)
LacY	<i>Escherichia coli</i>	Oligosaccharide:H <sup>+</sup> Symporter (OHS) (2.A.1.5)	LacY symp (PF01306)
MelB	<i>Escherichia coli</i>	Glycoside-Pentoside-Hexuronide: Cation Symporter (GPH) (2.A.2)	MFS 2 (PF13347)

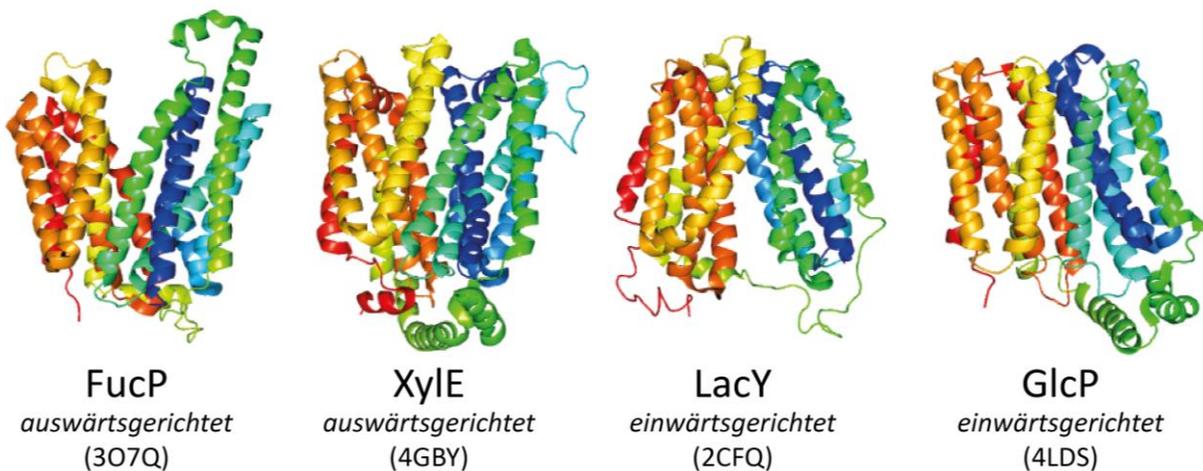
### **Strukturen repräsentieren unterschiedliche Konformationen im Reaktionszyklus**

Zucker Transporter der MFS bestehen meist aus 400 bis 600 Aminosäuren und 12 Transmembranhelices, angeordnet in pseudosymmetrische 6-Helix Bündel, einer C- und einer N-Domäne. Xyle und GlcP, die wie GLUT1 zur *Sugar Porter* Familie zählen, besitzen neben der typischen MFS-Faltung (Abbildung 9) eine intrazelluläre helikale Domäne, die zumindest in GLUT1 für das intrazelluläre *gating* essentiell ist [128, 129].

Der erste Transporter der MFS, für den eine Struktur gelöst wurde war LacY im Jahr 2003 (einwärtsgerichtet) [130]. Es folgten Strukturen von FucP (auswärtsgerichtet) [131], Xyle (auswärtsgerichtet) [132] und GlcP (einwärtsgerichtet) [133]. Die vorhandenen Strukturen zeigen unterschiedliche Konformationen, die verschiedene Zustände im Transportzyklus repräsentieren. Für LacY und Xyle wurden daraufhin weitere Strukturen gelöst, sodass für diese Transporter Strukturen in mehreren Konformationen bekannt sind. Eine Übersicht bekannter Strukturen ist in Tabelle 3 gegeben. Es sind auch okkludierte Zustände beschrieben, in denen die Bindestellen im Zuge der Konformationsänderungen von keiner Seite der Membran zugänglich sind.

**Tabelle 3: Veröffentlichte Strukturen von LacY, XylE, FucP und GlcP.** Die Strukturen sind den globalen Konformationen im *Alternating Access Model* zugeordnet. Die Substrate Substrat-gebundener Konformationen sind angegeben. Experimentell bestimmte Strukturen sind in blau, Modellstrukturen in rot hervorgehoben. Angegeben sind jeweils die Identifikatoren der Datensätze in der *Protein Databank* (PDB) bzw. *Protein Model Database*. mut = Struktur einer Mutante.

	auswärtsgerichtet	auswärtsgerichtet okkludiert	vollständig okkludiert	einwärtsgerichtet okkludiert	einwärtsgerichtet
LacY	PM0077183 (Modellstruktur auf FucP-Basis) [134]	4OAA (mut + TDG) [135] 4ZYR (mut + NPG) [136]	PM0079313 (Modellstruktur) [137]		1PV6 (mut), 1PV7 (mut + TDG) [130] 2CFP, 2CFQ [138] 2V8N [139] 2Y5Y (mut + label) [140]
XylE		4GBY (+ Xylose), 4GBZ (+ Glucose), 4GCO (+ Br-Glucose) [132]		4JA3 (+ Xylose) [141]	4QIQ [142] 4JA4 [141]
FucP	3O7P (mut), 3O7Q [131]				
GlcP					4LDS [133]



**Abbildung 9: Strukturen von FucP, XylE, LacY und GlcP in verschiedenen Konformationen.** Die jeweiligen Identifikatoren der Datensätze in der *Protein Databank* (PDB-ID) sind angegeben. Die Strukturen weiterer Konformationen sind bekannt und in *Tabelle 3* gegenübergestellt.

Ein Vergleich zwischen den Transporter-Strukturen zeigt, dass sie aus vier Helix-Triplets aufgebaut sind. Diese dienen als funktionale Segmente, die in verschiedenen Transportern in unterschiedlicher Reihenfolge kombiniert vorliegen. Diese Beobachtungen führten zur Formulierung eines Homologie-Modells, das durch *Triplet-Shuffling* eine bessere Konservierung funktional wichtiger Aminosäuren in verschiedenen Transportern ergab [102, 143–145]. Die drei Helices eines jeden Triplets haben unterschiedliche Funktionen: Die ersten Helices in jedem der vier Triplets bilden eine hydrophile Kavität, welche die Substratbindestellen enthält. Diese sind im Zentrum der Membran lokalisiert. Die zweiten Helices in jedem der vier Triplets bilden die Seitenwände der Kavität und sind direkt in die

Konformationsänderungen involviert. Die dritten Helices in jedem der vier Triplets interagieren mit der umgebenden Membran und sind nicht an der Ausbildung der Kavität beteiligt.

### ***Alternating Access und strukturelle Dynamik: Mehr als nur rocker switch***

In einigen Strukturen enthält die Substratbindestelle ein Zuckermolekül. Der Zucker wird dabei von mehreren aromatischen Aminosäureresten umgeben, die ihn von dem wässrigen Medium abschirmen. Soweit bekannt, werden in allen Symportern der MFS die Substrate asymmetrisch durch die zwei Transporter-Hälften gebunden. In LacY zeigt D-Lactose mehr Interaktionsstellen mit der N-Domäne [135], während in XylE die C-Domäne hauptverantwortlich für die Koordination von D-Xylose ist [132]. Für LacY wird angenommen, dass die Zuckerbindung die Bildung einer Substrat-okkludierten Konformation beinhaltet, bei der sich die N- und C-terminalen Hälften bewegen, während die Seitenketten den Zucker binden [138, 139, 146]. Dieser Interpretation nach induziert die Bindung des Zuckermoleküls die Konformationsänderungen, die zum *Alternating Access* führen [125]. Im okkludierten Zustand ist der Zucker optimal gebunden, weshalb die Bildung des okkludierten Zustands in der Literatur auch als *induced fit* beschrieben ist. Die erhöhten Substrat-Protein-Interaktionen reduzieren die Energiebarriere für die Konformationsänderung im protonierten Carrier. Die katalytische Energie für den Transport wird auf diese Weise durch die Substrat-Protein-Interaktion rekrutiert. In einem Energiediagramm nach Madej et al. wird der okkludierte Zustand als hochenergetisches, metastabiles Intermediat im Zuckertranslokationsweg beschrieben [144, 146].

*Alternating Access* gilt als allgemein anerkanntes Prinzip für den Carrier-vermittelten Transport [134]. Die verschiedensten Experimente an LacY bestätigen globale Konformationsänderungen im Transporter, die zum *Alternating Access* der Substratbindestelle führen [113, 147]. Für MFS Zuckertransporter werden im Allgemeinen zwei Mechanismen für die Konformationsänderungen im Zuge des *Alternating Access* diskutiert: Eine starre Rotation der beiden Helix-Bündel (*rocker switch* Mechanismus) [135, 142, 148] oder das Öffnen und Schließen der Kavität durch bewegliche Proteinsegmente (*flexible gates* Mechanismus) [137].

Für LacY gibt es Hinweise für beide Mechanismen: Eine starre Rotation der beiden Domänen um 30 - 60° beschreibt die notwendige Konformationsänderung für den Übergang von der nach außen geöffneten in die nach innen geöffnete 3D-Struktur [98, 134, 149], ein Hinweis auf einen *rocker switch*-ähnlichen Mechanismus. Andere Ergebnisse auf Basis von Modellstrukturen für LacY legen nahe, dass sich intrazelluläre und extrazelluläre Hälften von LacY unabhängig voneinander öffnen und schließen können und somit den Zugang zur zentralen Bindestelle kontrollieren [137]. Für LacY und XylE wurde die zytoplasmatische TM-Helix 11 als zentral für den *gating*-Mechanismus beschrieben [150]. Beide Studien liefern Hinweise auf ein mögliches *gating* während des Transportzyklus und stützen den *flexible gates* Mechanismus. Für die *Sugar Porter* Familie (GlcP, XylE,

GLUT1) spielt sehr wahrscheinlich die intrazelluläre Domäne eine entscheidende Rolle im *gating* [98]. Eine Studie zu GLUT1 identifiziert vier flexible *gates* [151]. In Xyle ist neben dem *gating* eine *rocker switch* -ähnliche Rotation der Domänen um etwa 16° erforderlich, um die entsprechende Konformationsänderung zu ermöglichen [98, 152].

Partiell okkludierte Konformationen unter anderem in Xyle (Tabelle 3) bestätigen, dass eine korrekte Beschreibung der strukturellen Änderungen im Zuge des *Alternating Access* sowohl die *rocker switch* Bewegung der Transporter-Hälften als auch flexible *gates* berücksichtigen müssen. Quistgaard et al. verdeutlicht dies in einem allgemeinen Transportmodell, in dem dünne *gates* von dicken *gates* unterschieden werden [110]. Die Dissoziation eines Substrats wird zunächst über die Schließung eines dünnen *gates* verhindert. Erst danach findet die Translokation der Substratbindestelle über die Membran statt, indem sich die zwei Transporter-Hälften *rocker switch* -ähnlich bewegen.

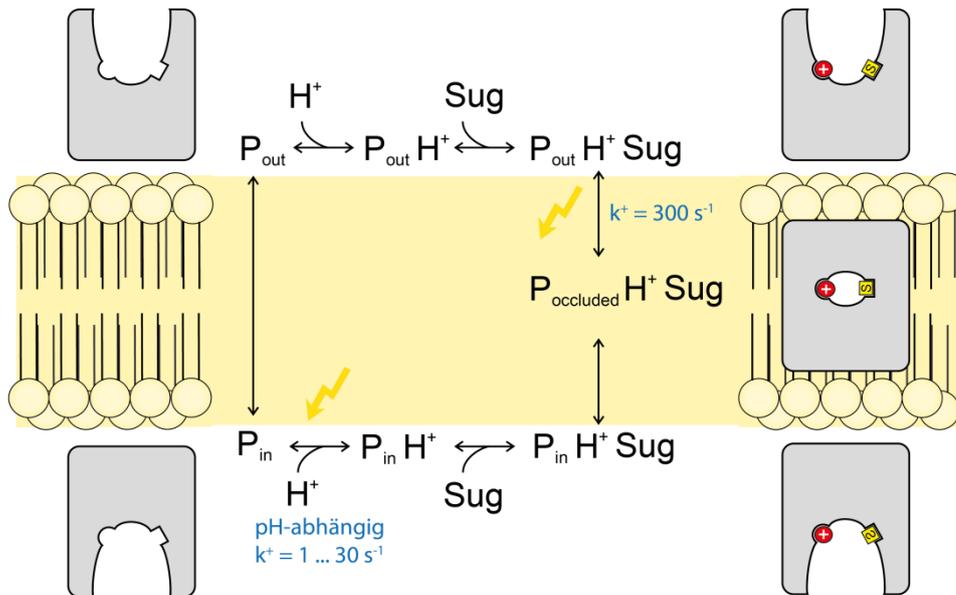
LacY wird im Allgemeinen als sehr dynamisches Protein betrachtet, was durch verschiedene Experimente bestätigt wird [153–157]. Diese Dynamik geht sehr wahrscheinlich weit über *rocker switch* Bewegungen und flexible *gates* hinaus. Aus einer Kollaboration mit Dr. Gregor Madej sind Ergebnisse entstanden, die bestätigen, dass es auch Substrat-abhängige Unterschiede in der Feinstruktur der Transporter gibt, die Einfluss auf die Transporteigenschaften haben könnten (Seite A10, Abbildung 65). Die Konformationsänderungen in LacY umfassen verschiedene Intermediate [135, 146, 158, 159], die in vereinfachten kinetischen Modellen nicht alle berücksichtigt werden können.

## Formulierung eines minimalen kinetischen Modells

Wie auf Seite 13f eingeführt, sind Carrier in der Lage verschiedene Transportmodi zu katalysieren. Für LacY wurde dies ausführlich untersucht [89, 160–162]:

- (1) *In vivo* wird der natürliche, über der inneren Plasmamembran anliegende elektrochemische Protonen-Gradient  $\Delta\mu_{H^+}$  (Zytoplasma negativ bzw. basisch) ausgenutzt, um Lactose entgegen des Konzentrationsgradienten zu transportieren (Lactose-Uptake).
- (2) In Anwesenheit eines Lactose-Gradienten verwendet LacY die freie Energie aus der Lactose-Translokation, um  $\Delta\mu_{H^+}$  zu generieren (Lactose-Influx/Efflux). Dieser Transportmodus wird in der vorliegenden Arbeit untersucht.
- (3) Sind  $\Delta\mu_{H^+}$  und der Lactose-Gradient null, katalysiert LacY im dauerhaft protonierten Zustand den passiven Austausch von Lactose (Lactose-Exchange).

Alle Transportmodi lassen sich in einem minimalen kinetischen Modell (MKM), einem 6-Zustands-Modell zusammenfassen. Das erste kinetische Modell für LacY wurde bereits 1979 formuliert [161]. Im Jahr 2010 wurde ein minimales kinetisches Modell auf Basis elektrophysiologischer Messungen formuliert [163] (Abbildung 10). Ein ähnliches Modell wurde auch für SGLT1 formuliert [108]. Das MKM entspricht einem Teilzyklus des allgemeinen 8-Zustands-Modells für Carrier-vermittelten Transport (Seite 13, Abbildung 6) und ergänzt es um eine okkludierte Transporter-Konformation.



**Abbildung 10: Das minimale kinetische Modell (MKM) für PMF-gekoppelten Symport in LacY nach Garcia-Celma et al. [163].** Mithilfe SSM-basierender Elektrophysiologie konnten zwei elektrogene Reaktionen identifiziert werden: Die schnelle Bildung des okkludierten Zustandes und die langsamere Protonenfreisetzung. In der vorliegenden Arbeit wird dieses Modell leicht korrigiert und stattdessen der *induced fit* des Zuckermoleküls und die Konformationsänderung des leeren Carriers (P) als elektrogene Reaktionen identifiziert (Seite 150, Abbildung 54). Das Modell lässt sich als Vereinfachung des 8-Zustands-Modells für Carrier-vermittelten Transport (Seite 13, Abbildung 6) auffassen. Für den passiven Lactose-Austausch ist nur ein Teil des Zyklus aktiv. Es finden die Reaktionen von der Bindung bis zur Freisetzung des Zuckers im permanent protonierten Carrier statt.

$\Delta\mu_{H^+}$ -getriebener Lactose-Uptake (Punkt 1 in obiger Aufzählung) und durch den Lactose-Gradienten getriebener Protonen-Influx (Punkt 2 in obiger Aufzählung) sind im MKM aufgrund des Netto-Ladungstransfers strikt Potential-abhängig, während der Lactose-Austausch (Punkt 3 in obiger Aufzählung), katalysiert durch den permanent protonierten Carrier, keine Spannungs-Abhängigkeit zeigt [160, 162]. Alle Transportmodi sind abhängig vom Protonierungszustand, also pH-abhängig: Insbesondere der Lactose-Uptake wird im Falle von LacY bei basischen pH-Werten bis pH 9,5 erhöht [160, 162]. Die Geschwindigkeit im Lactose-Uptake und -Austausch werden jedoch bei extremem Protonenmangel reduziert, weil der Transporter vermehrt im unprotonierten Zustand vorliegt, was zu einer Erhöhung der KM-Werte führt [164].

### ***Mutanten ohne Protonenbindestelle***

Jeder Symporter hat eine diskrete Protonenbindestelle, ein Aspartat oder ein Glutamat. Im Uniporter GLUT1 befindet sich dagegen an entsprechender Position ein Asparagin [144]. Eine Neutralisierung der negativ geladenen Protonenbindestelle durch Mutation hat einen vollständigen Verlust der  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ -getriebenen *Uptake*-Aktivität zur Folge. Die entsprechenden Mutanten (E325A LacY [80], D46N FucP [131], D27N XylE [144], D22N GlcP [133]) katalysieren aber passiven Zucker-Austausch, teilweise mit Raten sogar höher als der wt. Der Zucker-Austausch ist damit eine Teilreaktion des Symports, die vom neutralisierten bzw. protonierten Carrier katalysiert wird, wie entsprechend im MKM berücksichtigt (siehe oben). Es finden Zucker-Bindung, die Konformationsänderung des beladenen Carriers und Zucker-Freisetzung statt. Diese Beobachtung zeigt auch, dass die Protonenbindung im Transportzyklus vor der Zuckerbindung stattfindet bzw. stattfinden kann.

E325A LacY zeigt zudem Zucker-Influx und -Efflux [80], sodass zusätzlich die Konformationsänderung des neutralisierten, leeren Carriers möglich sein muss. Dies entspricht einem Uniport-Mechanismus, wie er auch in GLUT1 zu beobachten ist. E325A LacY kann als permanent protonierter wt Carrier (PH) betrachtet werden. Ein Uniport in E325A LacY macht daher deutlich, dass die Kopplung zwischen Protonen- und Zuckertranslokation in LacY nicht perfekt ist und das MKM kein vollständiges Bild für alle Transportmodi in LacY zeichnet. Sehr wahrscheinlich ergibt sich in wt LacY eine endliche Protonentranslokationsrate bzw. ein Protonenleck, das durch die Konformationsänderung im protonierten Carrier (PH) erklärt werden könnte.

### ***Anfangszustand und ratenlimitierende Reaktionen***

Als Anfangszustand im Transportzyklus von LacY wird die einwärtsgerichtete Konformation angenommen [124, 130]. Hierauf weisen verschiedene Kristallstrukturen hin, die alle in der einwärtsgerichteten Struktur gelöst wurden, sodass diese Konformation wahrscheinlich die niedrigste freie Energie aufweist. Zudem wurde gezeigt, dass die Zuckerbindung an den auswärtsgerichteten Carrier unabhängig von der Zuckerkonzentration ist, was nur durch ein vorgelagertes langsames Gleichgewicht erklärt werden kann [165, 166], wie es eine langsame Protonenfreisetzung innen bzw. eine langsame Konformationsänderung von der einwärts- in die auswärtsgerichtete Konformation darstellen würde. Die Zuckerbindung induziert einerseits direkt die Konformationsänderung des beladenen Carriers, andererseits aber auch indirekt über das vorgelagerte Gleichgewicht die Konformationsänderung des leeren Carriers vom einwärtsgerichteten Anfangszustand in die auswärtsgerichtete Konformation.

Je nach Triebkraft für den Transport ergibt sich ein anderer ratenlimitierender Schritt für den Zyklus. Es ist anzumerken, dass in der Literatur für LacY verschiedene Meinungen diesbezüglich zu finden sind, wobei die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Evidenzen ein von diesen Meinungen

abweichendes Modell für die ratenlimitierenden Reaktionen im Transportzyklus stützen (*Seite 177, Abbildung 59*). Dennoch soll kurz die Literatur diesbezüglich zusammengefasst werden. Für den Lactose-getriebenen Symport (Efflux/Influx) wird die Protonenfreisetzung oder die nachfolgende Konformationsänderung des leeren Carriers als geschwindigkeitsbestimmende Reaktion angenommen [*89, 160*]. In Anwesenheit von  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  (*Uptake*) wird dagegen diese ratenlimitierende Reaktion soweit beschleunigt, dass  $v_{\text{max}}$  um einen Faktor 3 erhöht und der  $K_{\text{M}}$ -Wert um bis zu eine Größenordnung reduziert ist [*73, 123*]. Weil sich die Transportrate in  $\text{D}_2\text{O}$  nur im Efflux-Modus, also ohne anliegendes Membranpotential ändert [*89*], müsse in Anwesenheit von  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  eine andere Reaktion als ratenlimitierend angenommen werden. Zunächst wurde hierfür die Dissoziation des Zucker-Moleküls vorgeschlagen [*124*]. Eine Erläuterung des kinetischen Isotopeneffekts von  $\text{D}_2\text{O}$  ist auf *Seite 98f* gegeben.

Durch kinetische Messungen der Konformationsänderungen des leeren und des beladenen Carriers konnten für LacY Ratenkonstanten bestimmt werden, die neue Überlegungen bezüglich der ratenlimitierenden Reaktionen angestoßen haben. Für die Konformationsänderung des leeren Carriers bzw. die Öffnung der periplasmatischen Kavität wurden Ratenkonstanten von  $20 \text{ s}^{-1}$  bis  $100 \text{ s}^{-1}$  ( $k_{\text{obs}}$ ) gefunden [*165–167*]. Weil LacY unter physiologischen Bedingungen, also getrieben durch das Membranpotential, eine Umsatzrate von etwa  $30 \text{ s}^{-1}$  bis  $50 \text{ s}^{-1}$  aufweist [*73*], wurde die Öffnung der periplasmatischen Kavität bzw. die Konformationsänderung des leeren Carriers zuletzt als ratenlimitierende Reaktion in Anwesenheit von  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  identifiziert [*125*]. Dass mittels  $\text{D}_2\text{O}$ -Messungen diese Zuordnung ausgeschlossen wurde, ist nicht mehr berücksichtigt worden.

Darüber hinaus gibt es verschiedene Ergebnisse für die Konformationsänderungen im beladenen Carrier. Hier müssen verschiedene Reaktionen separat betrachtet werden. So wurde für LacY die Bindung von NPG in einem 2-Zustands-Modell beschrieben. Der schnellen Zuckerbindung ( $k_{\text{obs}} = 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) folgt eine Konformationsänderung im beladenen Carrier, die mit  $250 \text{ s}^{-1}$  ( $k_{\text{obs}}$ ) relativ schnell ist [*168*]. Die wahrscheinlich folgende Substrat-Okklusion wird dagegen als ratenlimitierende Reaktion im Zuckertranslokationsweg betrachtet, wie das Energiediagramm nach Madej et al. zeigt [*144, 146*]. Die Geschwindigkeit der vollständigen Konformationsänderung im beladenen Carrier, von der Zuckerbindung bis zur Zuckerfreisetzung, konnte indes nicht experimentell bestimmt werden. Der Transport von D-Lactose in LacY wurde jedoch in einem 4-Zustands-Modell auf Basis elektrophysiologischer Daten simuliert [*163*]. Um die Daten korrekt zu simulieren, muss die Ratenkonstante der Vorwärtsreaktion des beladenen Carriers signifikant schneller sein als die der Vorwärtsreaktion des leeren Carriers. Die *on*-Rate des beladenen Carriers wird dort mit  $250 \text{ s}^{-1}$  und die *on*-Rate des leeren Carriers mit  $30 \text{ s}^{-1}$  angenommen.

Es ist anzumerken, dass  $\Delta\mu_{H^+}$  die Umsatzrate im *Exchange*-Modus nicht beeinflusst [160–162], sodass eine Reaktion im Zuckertranslokationsweg, z.B. die Konformationsänderung des beladenen Carriers ratenlimitierend sein könnte. Gleichzeitig ist die Umsatzrate im *Exchange*-Modus signifikant schneller als die im *Efflux*-Modus. Beides ist kompatibel mit der Beobachtung, dass die Konformationsänderung im beladenen Carrier schneller ist als die im leeren Carrier.

Zusammenfassend unterscheiden sich die Ratenkonstanten der Konformationsänderungen im beladenen und leeren Carrier für den Transport von D-Lactose ohne anliegendes Membranpotential nur geringfügig: Die des beladenen Carriers kann mit etwa  $250\text{ s}^{-1}$ , die des leeren Carriers mit etwa  $50\text{ s}^{-1}$  angenommen werden. Die Ratenkonstante der Konformationsänderung des protonierten, Zucker-freien Carriers (PH) ist nicht bekannt. Es ist allerdings aufgrund ähnlicher Influx-Raten in E325A LacY und wt LacY [80] denkbar, dass sie nicht viel niedriger ist als die Ratenkonstante der Konformationsänderung des leeren Carriers (P). Sie wird in den kinetischen Modellen der Literatur jedoch nicht berücksichtigt.

### ***Symmetrie im Transportzyklus***

Eine grundlegende Fragestellung betrifft die Symmetrie des Transportmechanismus. Erfolgt der einwärts- und auswärtsgerichtete Symport mit derselben Geschwindigkeit, wenn die entsprechenden elektrochemischen Substratgradienten und das Membranpotential ein umgekehrtes Vorzeichen aufweisen? Oder bedingt die Struktur des Transporters eine Asymmetrie im Transportvorgang? Ist LacY für den *in vivo* vorherrschenden einwärtsgerichteten Transport optimiert?

Influx und Efflux in wt LacY zeigen bei pH 7,5 sehr ähnliche Umsatzraten [80]. Die pK-Werte der Protonenfreisetzung für Influx (7,5) [163] und Efflux (8,5) [89] zeigen Unterschiede in der Protonen-Affinität von etwa einer Größenordnung, können aber dennoch als relativ ähnlich bezeichnet werden. Damit sind die Eigenschaften der Protonenfreisetzung in der einwärts- und auswärtsgerichteten Konformation nahezu symmetrisch. Es ist jedoch anzumerken, dass der pK-Wert der Zuckerbindung mit  $> 10,5$  stark davon abweicht [164, 169].

Die KD-Werte für die Bindung von D-Lactose an wt LacY in *rso* und *iso* Vesikeln sind mit 1 mM identisch [170], sodass LacY auch hinsichtlich Zuckerbindung/-freisetzung symmetrische Eigenschaften aufweist. Zuvor wurde eine Asymmetrie in den KM-Werten für Efflux und Influx bei gleichbleibender Umsatzrate gefunden [171], was dem symmetrischen Modell widerspricht. Auch Viitanen et al. zeigt, dass sich der KM-Wert für Influx (20 mM) von dem für Efflux (2 mM) bei gleichbleibender Umsatzrate unterscheidet [73]. Es ist anzumerken, dass die KM-Werte (2 - 20 mM) in allen Fällen größer sind als die KD-Werte (1 - 10 mM [170, 172]). Die Ursache hierfür ist ungeklärt (Seite 55, Gleichungen G34 und G37). Interessanterweise sind Efflux- und Influx-Raten von E325A

LacY im Gegensatz zu wt LacY unterschiedlich. Die Influx-Rate von E325A LacY entspricht etwa der des wt, während die Efflux-Rate weniger als 20 % der Efflux-Rate des wt entspricht [80]. Der Uniport in E325A LacY könnte daher leicht asymmetrisch sein. Es ist jedoch anzumerken, dass E325A LacY kaum Efflux im *Counterflow*-Experiment zeigt [80] und Influx-Experimente naturgemäß keine genauen Ergebnisse liefern.

Da für LacY die Hinweise auf symmetrisches Transportverhalten überwiegen, gilt im Allgemeinen die Annahme, dass die Transporter bezüglich der Transporteigenschaften symmetrisch funktionieren und nicht intrinsische Transporter-Eigenschaften eine bestimmte Transportrichtung begünstigen. Dem gegenüber steht die Aussage, dass der einwärtsgerichtete Zustand von LacY die niedrigste Energie hat und als Anfangszustand im Reaktionszyklus interpretiert wird [124, 130]. Liegt der Transporter zu 90 % im einwärtsgerichteten Zustand vor, so muss die Rückwärtsrate des leeren Carriers eine 10mal größere Ratenkonstante aufweisen als seine Vorwärtsrate. Dies würde den Efflux gegenüber dem Influx kinetisch begünstigen, was den experimentellen Daten widerspricht (siehe oben). Ein vollkommen symmetrisches Transportverhalten wäre mit einem definierten Anfangszustand nicht vereinbar.

### ***Reihenfolge der Substratbindung***

In der Literatur wird die Bindung von Zucker und Proton an LacY mit definierter Reihenfolge angenommen. Zunächst würde die Bindung des Protons, dann die Bindung des Zuckers erfolgen, der die Konformationsänderung im beladenen Carrier induziert [124, 173]. Für diese Reihenfolge gibt es drei voneinander unabhängige Hinweise. Erstens hat LacY einen relativ hohen pK-Wert für die Zuckerbindung von  $> 10,5$ , während im Darm pH-Werte von  $< 9,5$  vorherrschen [174, 175]. Das Gleichgewicht des auswärtsgerichteten Carriers liegt demnach auf Seiten des protonierten Zustands. Zweitens steigen die KM-Werte mit dem pH-Wert, sodass die Protonenbindung die Affinität zum Zucker erhöht [164, 176, 177]. Und drittens zeigen die 3D-Strukturen, dass der Zucker den Zugang zur Protonenbindestelle blockieren könnte [135]. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die *on*-Rate der Zuckerbindung pH-unabhängig ist [164], also der Zucker an den unprotonierten Carrier binden kann. Dies widerspricht einer strikten Reihenfolge der Bindung von Proton und Zucker.

Die Freisetzung der Substrate wird analog zur Bindung in definierter Reihenfolge angenommen: Nach der Konformationsänderung des beladenen Carriers, erfolgt die Zuckerfreisetzung. Dadurch ist in der Kavität Platz für Wassermoleküle geschaffen, welche die Protonenfreisetzung ermöglichen [135]. Außerdem wurde gezeigt, dass die Protonenfreisetzung die Konformationsänderung des leeren Carriers induziert [178].

## Elektrophysiologie

Im Gegensatz zu Enzymen, müssen Transporter für viele funktionelle Analysen innerhalb der Membran lokalisiert sein. Katalysiert der Transporter eine elektrogene Reaktion, also eine Verschiebung von Ladung über die Membran, eignet er sich damit hervorragend für elektrophysiologische Untersuchungen. Diese haben den Vorteil gegenüber anderen Methoden wie Transportmessungen mit radioaktiv markierten Substraten oder Bindungsstudien mit Fluorophor-markierten Transportern, dass keine Veränderung an Substrat und Transporter notwendig sind.

### Die elementare elektrogene Reaktion

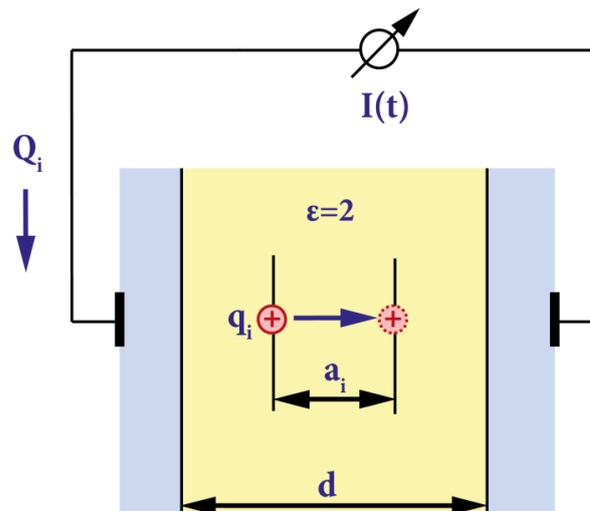
Für elektrophysiologische Messungen sind nur diejenigen Reaktionen zugänglich, die elektrogen sind. Ein einfaches Beispiel für eine solche Reaktion ist die Verschiebung einer Ladung über eine definierte Distanz. Damit diese Reaktion elektrogen ist, also eine Kompensationsladung  $Q$  im externen Messstromkreis fließen kann (*Gleichung G18*), muss sie in einem Dielektrikum, umgeben von zwei leitenden Phasen stattfinden; in unserem Fall innerhalb der Membran, die von beiden Seiten vom wässrigen Medium umgeben wird (*Abbildung 11*). Der Fluss der Kompensationsladung ist transient und ein kapazitiver Peakstrom ist messbar [91].

$$Q_i = q_i \cdot \frac{a_i}{d} \quad \text{mit } q_i = e \cdot z_i \quad \text{G18}$$

*Q<sub>i</sub>: Kompensationsladung im Messstromkreis; q<sub>i</sub>: Ladung in der Membran; a<sub>i</sub>: Distanz der Ladungsverschiebung;  
d: Dicke der Membran; e: Elementarladung; z<sub>i</sub>: Ladungszahl*

Wenn ein elektrogener Membrantransporter innerhalb einer Lipidmembran betrachtet wird, können Ladungsverschiebungen prinzipiell sehr verschiedene Ursachen haben. So kann es sich um die Bewegung des geladenen Substrats handeln oder um elektrogene Konformationsänderungen innerhalb des Transporters, wie die Bewegung geladener Seitenketten oder die Rotation dipolarer Gruppen wie Transmembranhelices. Andererseits aber auch um die Verschiebung von Ladungsträgern orthogonal zur Membranachse aufgrund von Wechselwirkungen zwischen Ionen und Lipidkopfgruppen [179]. Letzteres führt dann im elektrophysiologischen Experiment zu Artefakten, die nicht mit der Transporter-Funktion korrelieren. Um die Kompensationsladung zu beschreiben, müssen demnach alle Beiträge zur Gesamt-Elektrogenität berücksichtigt und die Summe individueller Ladungsbewegungen betrachtet werden. Im dimensionslosen dielektrischen Koeffizienten  $\alpha_i$  sind diese zusammengefasst (*Gleichung G19*).

$$Q_i = \alpha_i \cdot e = \frac{1}{d} \cdot \sum_{\kappa} z_{i\kappa} a_{i\kappa} \cdot e \quad \text{G19}$$



**Abbildung 11:** Schematische Darstellung der Verschiebung einer Ladung  $q_i$  über die Distanz  $a_i$  innerhalb eines Dielektrikums der Dicke  $d$ . Infolge ergibt sich der Fluss einer Kompensationsladung  $Q_i$  im äußeren Stromkreis, der elektrophysiologisch als transienter Strom messbar ist.

Diese Gleichung gilt nur für ein homogenes Dielektrikum, also positionsunabhängige dielektrische Konstanten innerhalb der Membran. In [Abbildung 4a \(Seite 7\)](#) ist dargestellt, dass die dielektrische Konstante in einer Lipiddoppelschicht selbst stark positionsabhängig ist. Auch innerhalb eines Membrantransporters ist die dielektrische Konstante positionsabhängig. In diesem Sinne müssen die dielektrischen Koeffizienten  $\alpha_i$  als phänomenologische Quantitäten betrachtet werden, die nicht direkt mit der geometrischen Distanz korrelieren. So können Zugänglichkeitsänderungen für das wässrige Medium im Protein auch ohne eine geometrische Verschiebung von Ladung, elektrogene Reaktionen darstellen, weil sich die dielektrische Konstante in der Umgebung einer Ladung verändert. Dies könnte durch Öffnen und Schließen von Wasser-gefüllten Kavitäten geschehen.

Ob eine elektrogene Reaktion messbar ist oder nicht, ist auch maßgeblich von der Geschwindigkeit der Reaktion abhängig. So ist die Kompensationsladung  $Q_i$  nur dann messbar, wenn die Reaktion in einem ausreichend kleinen Zeitintervall  $dt$  stattfindet und somit ein großer Strom  $I_{\text{kap}} = Q_i/dt$  resultiert. Zusammengefasst ist ein großer kapazitiv gekoppelter Strom für Ladungsverschiebungen messbar, wenn die Ladung schnell und über eine große dielektrische Distanz verschoben wird. Letzteres bedeutet eine große Positionsänderung orthogonal zur Membranachse und/oder eine große Änderung der Dielektrizität der Umgebung.

## **Elektrophysiologische Methoden und die Untersuchung bakterieller Transporter**

Im vorangehenden Abschnitt wurde dargelegt, dass die Messbarkeit eines Transporters maßgeblich von der Elektrogenität und Geschwindigkeit der zu untersuchenden Teilreaktion abhängig ist. Von wesentlichem Interesse ist dabei die Gesamt-Elektrogenität, die auch von der Anzahl der gleichzeitig beobachteten Transporter bestimmt wird.

Ionenkanäle können aufgrund ihrer hohen Wechselzahl von bis zu  $10^7 - 10^8 \text{ s}^{-1}$  und dem damit verbundenen induzierten elektrischen Strom von etwa 1 - 10 pA auf Einzelmolekül-Ebene untersucht werden; und das bereits seit den 1970er Jahren [180, 181]. Ein schnelles Carrier-Molekül hat eine um vier Größenordnungen niedrigere Umsatzrate. Statt Einzelmoleküle, sind makroskopische Teilchen-Populationen notwendig, um Ströme im messbaren Bereich zu erhalten. Damit verbunden ist ein Informationsverlust über den Zustand des einzelnen Transporters. Es werden Zustandsverteilungen beobachtet.

### ***Elektrophysiologische Methoden: Eine Einführung***

Die moderne Elektrophysiologie wurde 1947 mit der Erfindung der Zwei-Elektroden Spannungsklemme (TEVC) begründet [182, 183]. Zwei Elektroden werden dabei direkt in die Zelle eingeführt, um mithilfe eines Rückkopplungs-Schaltkreises das Zellmembranpotential auf einem definierten Wert konstant zu halten. Die Methode wurde seither stetig verbessert, sodass heute mithilfe von Mikroelektroden auch wesentlich kleinere Zellen verwendet werden können. Prokaryotische Zellen sind im Vergleich zu eukaryotischen Zellen um eine bis zwei Größenordnungen kleiner und daher nicht für das TEVC-Experiment zugänglich. Eine Untersuchung bakterieller Transporter ist damit nur über heterologe Expression möglich. Hier bereitet das *targeting* der prokaryotischen Transporter zur eukaryotischen Plasmamembran oftmals Schwierigkeiten.

In den 1970er Jahren wurde auf Basis der traditionellen TEVC-Methode die Patch-Clamp Technik entwickelt, welche erstmals Einzelkanal-Untersuchungen ermöglichte [184, 185]. Hier wird lediglich eine Elektrode zur Messung des Membranpotentials benötigt. Im Patch-Clamp Experiment wird die Mikropipette nicht mehr in die Zelle eingeführt, sondern lediglich der Membran dicht aufgelagert, sodass es zu einem Gigaohm-Seal kommt. Nach Erreichen des Gigaohm-Seals kann einer von mehreren Patch-Clamp Konfigurationen gewählt werden: In der *whole-cell* Konfiguration werden alle Transporter innerhalb der Membran beobachtet, während im *inside-out*- oder *outside-out-patch* Einzelmolekül-Messungen möglich sind [186]. Auch prokaryotische Zellen können prinzipiell gepatcht werden. Problematisch sind jedoch die niedrigen Transportraten der Carrier in Verbindung mit der geringeren Zelloberfläche von Bakterien, die dann selbst in einer *whole-cell* Konfiguration maximal für Ströme im Bereich eines Einzelkanals ausreichen würden. Mögliche Verbesserungen des Signal-Outputs versprechen *giant liposomes* oder *giant E.coli*, finden in der Praxis jedoch wenig Anwendung [187].

### ***Modellmembransysteme in der Elektrophysiologie***

Die planare Lipidmembran (*black lipid membrane*, BLM) war bereits 1963 die erste Modellmembran, mit der Membranprotein-vermittelte Transportprozesse untersucht werden konnten [188–191]. Zur Herstellung einer BLM wird ein Lipidgemisch über die kreisrunde Öffnung eines Septums mit einem

Durchmesser von etwa 1 mm gestrichen. Das Septum ist eine dünne Festkörperschicht innerhalb einer Teflon-Küvette, die zwei wässrige Phasen voneinander trennt. Durch spontane Selbstassemblierung der Lipidmoleküle entsteht die 4 - 5 nm dicke Lipiddoppelschicht [192–194]. Durch Anlagerung von Membranfragmenten (MF), die das zu untersuchende elektrogene Protein enthalten, kann ein kapazitiv gekoppeltes System zwischen BLM und MF etabliert werden [195] (ähnlich wie in *Abbildung 12* auf *Seite 33*; Zwischen Goldelektrode und SSM befände sich bei einer BLM die zweite wässrige Phase). Durch die Einlagerung von Ionophoren wird der durch Ionen-Transport induzierte Aufbau eines Membranpotentials verhindert und es können stationäre Transporter-Ströme gemessen werden. Alternativ können die zu untersuchenden Transporter in die BLM inkorporiert werden [196], sodass direkt stationäre Ströme resultieren. Hier kann die Abhängigkeit der Transporter von der Zusammensetzung der Lösungen auf beiden Seiten der Membran untersucht werden. Ein schneller Lösungswechsel ist jedoch aufgrund der mechanischen Instabilität kaum möglich. Abhilfe schaffen *caged compounds*, die allerdings nicht für jedes Substrat erhältlich sind [197].

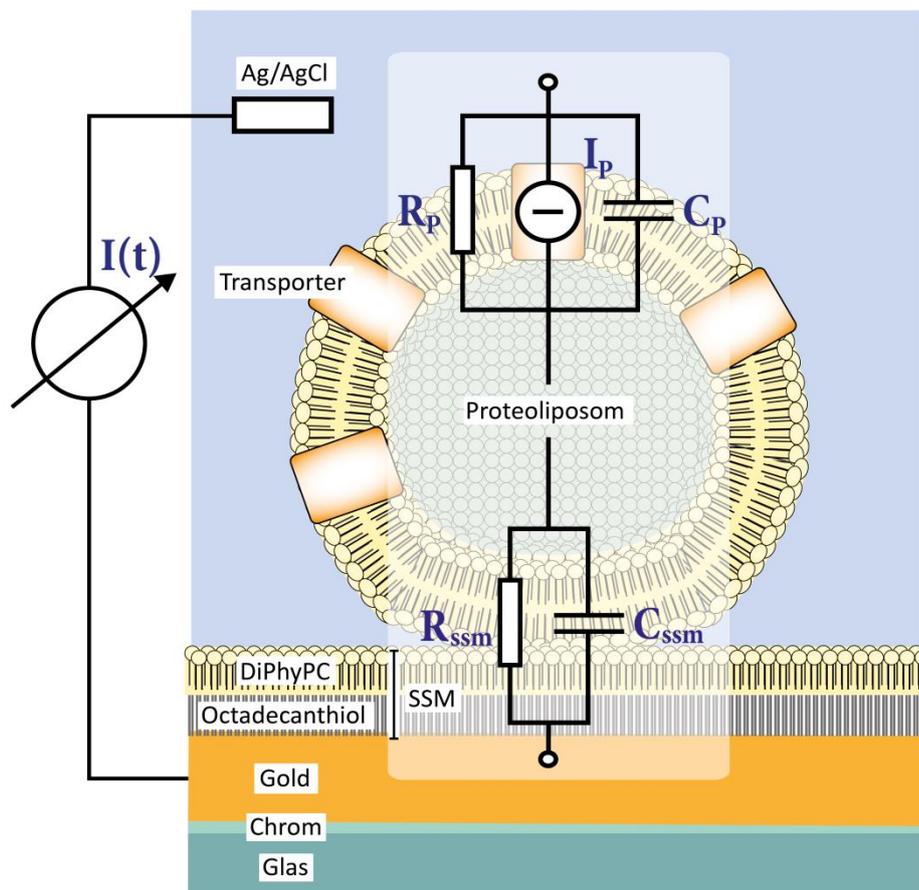
Als Weiterentwicklung der BLM wurde in den 1990er Jahren die festkörperunterstützte Lipidmembran (sBLM oder *solid supported membrane*, SSM) beschrieben [198], bei der die Lipidschichten auf einem Festkörper-Substrat, beispielsweise Glas oder Gold immobilisiert sind. Die damit verbundene im Vergleich zur BLM massiv erhöhte mechanische Stabilität ermöglicht einen schnellen Lösungswechsel [199] über der Membran und damit die Untersuchung des Membranproteins unter verschiedenen Bedingungen. Hier ist ebenso eine Anlagerung von MF oder Proteoliposomen möglich. Jedoch kann aufgrund des fehlenden zweiten Kompartiments nur die Zusammensetzung der Lösung auf der einen Seite der Membran definiert werden, während das Innere des Proteoliposoms oder der Zwischenraum zwischen SSM und MF nicht direkt zugänglich ist. Auch können keine stationären Ströme detektiert werden.

Die SSM-basierende Elektrophysiologie wurde technisch stetig weiterentwickelt [200, 201]. Das Grundgerüst der SSM besteht aus einer selbstassemblierenden Monoschicht (SAM) [202] aus Merkaptan-Molekülen, die über die Thiolgruppe an eine Gold-Oberfläche auf einem Glas-Substrat gebunden ist. Die freien hydrophoben Fettsäureketten ermöglichen bei Inkubation in einem wässrigen Lösungsmittel die Anlagerung einer Lipid-Monoschicht, getrieben durch den Hydrophoben Effekt. Auf der so gebildeten SSM können nun MF oder Proteoliposomen aufgelagert werden. Die Gesamtheit der Transporter aller aufgelagerten MF oder Proteoliposomen tragen dann zum kapazitiv gekoppelten Messstrom bei, der je nach LPR auch für langsame Transporter mit Umsatzraten im Bereich von  $10 \text{ s}^{-1}$  im 1 nA Bereich liegen kann. Mittels SSM basierender Elektrophysiologie konnten bisher zahlreiche Transporter charakterisiert werden [163, 203–205], darunter auch

Ionenkanäle [206, 207] und eukaryotische Transporter intrazellulärer Kompartimente [208]. Eine vergleichende Betrachtung der elektrophysiologischen Methoden zur Charakterisierung von Membrantransportern findet sich in Grewer et al. [209].

## Kapazitive Kopplung auf der SSM und Interpretation der Signale

Zwei aneinander gelagerte Lipid-Doppelschichten werden im Ersatzschaltbild als in Reihe geschaltete RC-Glieder geschrieben. Die proteoliposomale Membran (PM) enthält zusätzlich das elektrogene Membranprotein, also eine parallel geschaltete Strom-Quelle  $I_p$  (Abbildung 12). Durch Aktivierung des Transporter-Stroms erfolgt die Aufladung der PM. In einem kapazitiv gekoppelten System, führt die Aufladung der PM zwangsläufig zur Aufladung der SSM. Damit verbunden ist ein Stromfluss im externen Messstromkreis [210]. Es erfolgt die Detektion eines kapazitiv gekoppelten Stroms  $I_{kap}$ . Die kapazitive Kopplung wurde bereits seit den 1970er Jahren zur elektrophysiologischen Charakterisierung von Membrantransportern an der BLM verwendet [211].



**Abbildung 12: Kapazitive Kopplung zwischen SSM und Proteoliposom.** Die SSM wird auf einer Goldschicht eines Glassubstrats hergestellt. Sie besteht aus einer selbstassemblierenden Octadecanthal-Monoschicht und einer aufgelagerten Monoschicht aus Diphytanoyl-Phosphatidylcholin-Molekülen (DiPhyPC). An der SSM können Proteoliposomen oder Membranfragmente angelagert werden, wodurch ein kapazitiv gekoppeltes System entsteht. Ein Stromfluss  $I_p(t)$  durch den Transporter in der PM führt zur Aufladung der Kondensatoren  $C_p$  und  $C_{SSM}$ . Dies führt zu einem transienten Stromfluss  $I(t)$  im externen Messstromkreis, der als kapazitiv gekoppelter Strom detektiert wird. Als Referenzelektrode fungiert eine Silberchlorid-Elektrode (Ag/AgCl).

Der kapazitiv gekoppelte Messstrom ist immer transient. Unabhängig davon, ob ein Transporter ausschließlich elektrogene *pre steady-state* Reaktionen zeigt oder auch im *steady-state* elektrogen ist, resultieren auf der SSM immer transiente Ströme.

### ***Steady-state und pre steady-state Signale auf der SSM***

Ogleich kein stationärer Transport auf der SSM beobachtet werden kann, ist es möglich Informationen über die *steady-state* Kinetik eines Transporters abzuleiten. Zudem können unter bestimmten Bedingungen *pre steady-state* Reaktionen isoliert betrachtet werden. Im Folgenden werden alle transiente Ströme, die in einem Messsystem ohne kapazitive Kopplung stationäre Ströme ergeben würden und aufgrund des steigenden Membranpotentials abklingen, als *steady-state* Signale bezeichnet. Auch wenn es sich faktisch um keinen stationären Zustand handelt, erleichtert diese Bezeichnung die Unterscheidung von *pre steady-state* Signalen, die auch in einem Messsystem ohne kapazitive Kopplung transiente Ströme ergeben würden.

Eine wesentliche Schwierigkeit im Zusammenhang mit elektrophysiologischen Messungen an der SSM ist die Unterscheidung zwischen *steady-state* und *pre steady-state* Reaktionen, weil eben beide auf der SSM transiente Ströme induzieren (*Seite 37, Abbildung 13*). Es gibt drei wesentliche Parameter, die aus einem transienten Stromsignal abgeleitet werden können: der Peakstrom, die Anstiegszeit  $\tau_1$  und die Abklingzeit  $\tau_2$ . Aus diesen Parametern können, je nachdem ob *steady-state* oder *pre steady-state* Signale betrachtet werden, unterschiedliche Informationen über die Transporter-Kinetik gewonnen werden. Dabei ist die Anstiegszeit  $\tau_1$  meist durch die Zeitauflösung des Systems limitiert, kann aber auch Informationen über die Position des elektrogenen Schrittes im Reaktionszyklus oder den Anfangszustand des Transporters liefern.

In einem typischen *steady-state* Experiment befindet sich der Transporter in einem stationären Zustand. Die Transportrate ist damit zeitunabhängig. Im SSM-Experiment erfolgt im Gegensatz dazu auch bei elektrogenen *steady-state* Aktivitäten ein Abklingen des Stroms, bedingt durch die Aufladung des Membrankondensators (*Seite 2, Gleichung G1*) und der strikten Potential-Abhängigkeit elektrogener Transporter (*Seite 18, Abbildung 8*). Infolge der Transporter-vermittelten Ladungsverschiebung resultiert eine Zunahme des Membranpotentials. Der weitere Ladungs-Transport wird aufgrund seiner Potential-Abhängigkeit inhibiert. Der kapazitiv gekoppelte Messstrom nimmt daher mit der Abklingzeit  $\tau_2$  ab (*Gleichung G20*) [198]. Die Abklingzeit ist umgekehrt proportional zum Peakstrom: Je größer die initiale Transporter-Aktivität, desto schneller steigt das Membranpotential. Der transiente Strom fällt schneller ab. Die Abklingzeit sinkt.

$$\tau_2 = \frac{C_{ssm} + C_p}{G_{ssm} + G_p + \frac{I_p}{U^*}} \rightarrow \tau_2 \sim \frac{U^*}{I_p} \quad \text{G20}$$

$\tau_2$ : Abklingzeit;  $I_p$ : Peakstrom;  $U^*$ : Konstante;  $C_{ssm}$ : Kapazität der SSM;  $C_p$ : Kapazität der PM;  
 $G_{ssm}$ : Leitfähigkeit der SSM;  $G_p$ : Leitfähigkeit der PM

Es kann auf der SSM demnach kein stationärer Transport beobachtet werden. Im SSM-Experiment wird die Spannungsänderung detektiert. Der Messstrom  $I(t)$  ist proportional zur Ableitung des Membranpotentials  $U(t)$ . Ein Klemmen der Spannung wie im TEVC- oder Patch-Clamp-Experiment oder die Zugabe von Ionophoren zum Erhalt stationärer Ströme wie in Messungen an der BLM ist bei Messungen an der SSM nicht möglich und würde unmittelbar zum Verlust des Signals führen. Dennoch kann der Peakstrom näherungsweise als proportional zur Transportrate unter *steady-state* Bedingungen angenommen werden, weil zu diesem Zeitpunkt noch kein signifikantes Membranpotential aufgebaut wurde. Der *steady-state* Peakstrom folgt wie die Umsatzrate der Michaelis-Menten Kinetik (*Gleichung G21*) [212, 213]. Zudem können die stationären Transporterströme aus dem transienten Messstrom mittels numerischer Prozessierung auf Basis der Schaltkreisanalyse rekonstruiert werden [210].

$$I_p = I_p^{\max} \cdot \frac{c_s}{c_s + K_M} \quad \text{G21}$$

$I_p$ : Peakstrom;  $I_p^{\max}$ : Peakstrom bei sättigender Substratkonzentration;  $c_s$ : Substratkonzentration;  
 $K_M$ : Halbsättigungskonzentration

Unter bestimmten Bedingungen, welche nur Teilreaktionen im Transportzyklus zulassen, kann ein Substratsprung zur Beobachtung einer einzelnen elektrogenen Reaktion führen, einem *pre steady-state* Signal. Eine *pre steady-state* Reaktion kann auch dann elektrogen sein, wenn der *steady-state* elektroneutral ist: So können sich zwei elektrogene *pre steady-state* Reaktionen entgegengesetzter Polarität im *steady-state* genau aufheben, zum Beispiel bei der entgegengesetzt gerichteten Bewegung geladener Proteinsegmente während der beiden Konformationsänderungen im *Alternating Access*. Im Fall einer *pre steady-state* Reaktion ist die Abklingzeit  $\tau_2$  nicht durch die Aufladung des Membrankondensators limitiert, sondern eine intrinsische Eigenschaft der beobachteten Reaktion. Der Kehrwert der Abklingzeit und der Peakstrom sind proportional zur beobachteten Reaktionsrate ( $k_{\text{obs}}$ ). Dies gilt nur unter Bedingungen, bei denen die verschobene Ladung, also das Peak-Integral, identisch und die Zeitauflösung des Systems nicht limitierend ist. Aus  $\tau_2$  lässt sich direkt die Ratenkonstante  $k_{\text{obs}}$  ableiten, die sich aus der *on*-Rate und der *off*-Rate der elektrogenen *pre steady-state* Reaktion zusammensetzt (*Gleichung G22*) [214].

$$\frac{1}{\tau_2} \sim k_{\text{obs}} = k_r + k_f \cdot \frac{c_s}{c_s + K_D} \quad \text{G22}$$

$\tau_2$ : Abklingzeit;  $k_{\text{obs}}$ : zusammengesetzte Ratenkonstante der Reaktion;  $k_f$ : Ratenkonstante der Vorwärtsreaktion;  
 $k_r$ : Ratenkonstante der Rückwärtsreaktion

Um zwischen *steady-state* und *pre steady-state* Signalen zu unterscheiden, ist die Beziehung zwischen  $I_p$  und  $\tau_2$  geeignet. Im Falle eines *steady-state* Signals sollte eine größere Transporterdichte zu einem höheren Peakstrom, zu einer schnelleren Aufladung des Membrankondensators, zu einer schnelleren Inhibition des Transports und damit zu einem schnelleren Abklingen des transienten Stroms führen (*Gleichung G20*). Für ein *pre steady-state* Signal korreliert  $\tau_2$  mit der Geschwindigkeit der Reaktion (*Gleichung G22*) und ist in der Regel, weil wesentlich geringere Ladungen transferiert werden, nicht durch die Aufladung des Membrankondensators bestimmt. Die Abklingzeit ist bei *pre steady-state* Signalen also unabhängig von der Transporterdichte. Die Transporterdichte oder LPR kann während des Rekonstitutionsprozesses variiert werden. Aber nur bei *steady-state* Signalen hat dies auch einen Einfluss auf die Abklingzeit. Meist sind *pre steady-state* Signale auch ohne Messungen bei verschiedenen LPRs leicht zu erkennen, weil sie wesentlich schneller sind und weniger Ladung transferieren als *steady-state* Signale. Zusätzlich resultiert aufgrund der hohen Geschwindigkeit der Reaktionen oft eine negative Komponente, die dem *pre steady-state* Peak folgt und mit der Systemzeitkonstante der Verbundmembran  $\tau_0$  abklingt [*199, 215, 216*] (*Gleichung G23*).

$$\tau_0 = \frac{C_{\text{ssm}} + C_p}{G_{\text{ssm}} + G_p} \approx (200 \pm 100) \text{ ms} \quad \text{G23}$$

Theoretisch können *pre steady-state* Reaktionen auch langsam sein. Und bei niedriger Elektrogenität zeigen auch *steady-state* Signale nach einer LPR-Änderung keine signifikante Änderung in den Abklingzeiten. Eine eindeutige Unterscheidung bedarf daher einer genauen kinetischen Analyse der beobachteten Signale.

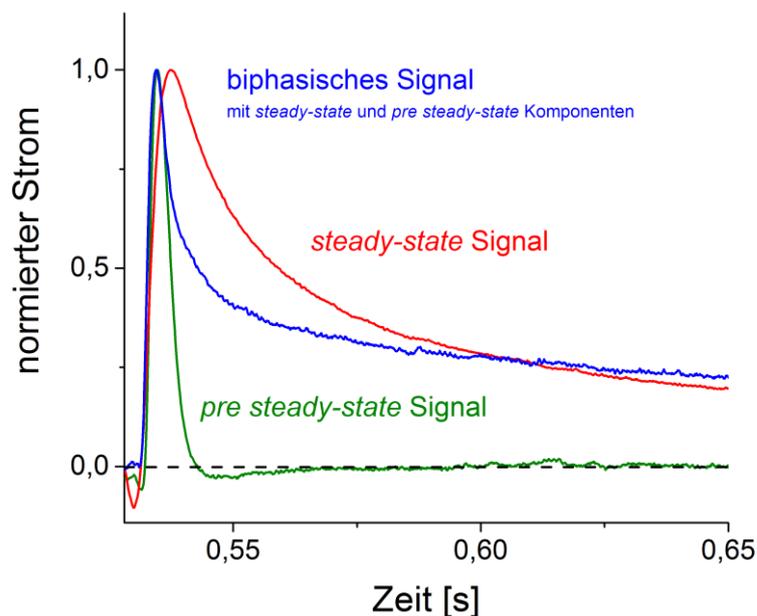
### ***Elektrophysiologie an LacY und biphasische Signale***

Elektrophysiologische Messungen an LacY zeigen, dass unter bestimmten Bedingungen das Abklingverhalten des transienten Stroms biphasisch erscheint (*Abbildung 13, blaue Kurve*), was auf zwei elektrogene Schritte im Transportzyklus hinweist [*163, 205*]. Die nur zum Zucker-Austausch fähige Mutante E325A LacY zeigte unter allen Bedingungen ausschließlich einen schnellen transienten Strom. Weil in den SSM Messungen die proteoliposomale Zucker-Konzentration null ist, findet nach dem Substratsprung lediglich die Reaktionsfolge Zucker-Bindung, Konformationsänderung und Zuckerfreisetzung statt. Dadurch konnte das schnelle Signal einer Zucker-induzierten Konformationsänderung zugeordnet werden (das vollständige Transportmodell

ist auf [Seite 24, Abbildung 10](#) beschrieben). Das langsame Signal in wt LacY korreliert hingegen mit dem *steady-state*.

Ein Weiterer Hinweis zur Zuordnung der Signale liefert die pH-Abhängigkeit der transienten Ströme in wt LacY. Im Säuren nimmt die langsame Komponente ab und der nahezu pH-unabhängige schnelle transiente Strom wird sichtbar. Das *steady-state* Signal wurde so der ratenlimitierenden Protonenfreisetzung zugeordnet, die im Säuren inhibiert wird und in der E325A Mutante nicht stattfinden kann. Die Ladung der *pre steady-state* Komponente macht etwa 6 % der gesamten Ladungstranslokation in einem LacY-Transportzyklus aus [\[205\]](#).

Um *steady-state* und *pre steady-state* Reaktionen separat analysieren zu können, sollten idealerweise Bedingungen geschaffen werden, in denen nur eine Teilreaktion beobachtet wird oder erheblich dominiert. Im Falle von E325A LacY kann die Konformationsänderung beobachtet werden, während bei leicht alkalischen pH-Werten in wt LacY die Protonenfreisetzung das elektrogene Signal dominiert. In einigen Situationen ist es jedoch erforderlich mit Bedingungen zu arbeiten, bei denen beide Reaktionen auftreten. Um biphasische Signale hinsichtlich des *steady-states* analysieren zu können, müssen die stationären Transporterströme aus den transienten Strömen rekonstruiert werden ([Seite 59, Gleichung G48](#)).



**Abbildung 13: Typische kapazitiv gekoppelte transiente Ströme an der SSM.** Es können elektrogene *steady-state* Reaktionen (rot) sowie elektrogene *pre steady-state* Reaktionen (grün) detektiert werden. Es ist ebenso möglich biphasische Signale (blau) zu detektieren, in denen elektrogener *steady-state* und *pre steady-state* überlagert sind. Das Abklingverhalten des *pre steady-state* Signals ist durch die Geschwindigkeit der Reaktion bestimmt ([Gleichung G22](#)). Durch eine *steady-state* Reaktion baut sich schnell ein signifikantes Membranpotential auf, wodurch auch *steady-state* Signale innerhalb von 500 ms abklingen. Auf der SSM wird daher kein stationärer Transport beobachtet.

# 2

## METHODEN

### Chemikalien-Liste

In *Tabelle 4* sind die wichtigsten Chemikalien gelistet. Für die Probenpräparation verwendete Chemikalien sind dem Methodenteil zu entnehmen. Wenn nicht anders angegeben, wurden diese von Sigma erworben.

**Tabelle 4: Liste der in Experimenten verwendeten Chemikalien.** Die für die Probenpräparation verwendeten Chemikalien sind nicht gelistet.

Name	Produktnummer	Hersteller	CAS
Zucker			
D-Glucose	G7528	Sigma	50-99-7
L-Glucose	A17496	Alfa Aesar	921-60-8
<sup>14</sup> C D-Glucose	NEC042X050UC	Perkin Elmer	
6-Desoxy-D-Glucose	D9761	Sigma	7658-08-4
2-Desoxy-D-Glucose	CN96.3	Roth	154-17-6
L-Fucose	KK10.3	Roth	2438-80-4
<sup>14</sup> C L-Fucose	ARC 0803	American Radiolabel Chemicals	
D-Xylose	95729	Sigma	58-86-6
L-Galactose	B21448	Alfa Aesar	15572-79-9
D-Galactose	G0750	Sigma	59-23-4
L-Arabinose	5118.2	Roth	5328-37-0
D-Arabinose	A10357	Alfa Aesar	10323-20-3
D-Altrose	258021000	Acros Organics	1990-29-0
L-Idose	286093	Santa Cruz Biotechnology	5934-56-5
L-Rhamnose	A16166	Alfa Aesar	3615-41-6
Lactose	L8783	Sigma	63-42-3
Lactulose	J60160	Alfa Aesar	4618-18-2
Melibiose	63630	Sigma	5340-95-4
TDG (Thiodigalactosid)	OG05033	Carbosynth Ltd	51555-87-4
Saccharose	S7903	Sigma	57-50-1

## Fortsetzung der Tabelle 4.

Name	Produktnummer	Hersteller	CAS
<b>Lipid und Detergenz</b>			
POPE (1-Palmitoyl-2-oleoyl-Phosphatidyl-ethanolamin)	850757C	Avanti Polar Lipids Inc.	26662-94-2
POPG (1-Palmitoyl-2-oleoyl-Phosphatidyl-glycerol)	840457C	Avanti Polar Lipids Inc.	268550-95-4
18:1 CL (Cardiolipin)	710335C	Avanti Polar Lipids Inc.	115404-77-8
Cholesterol	700000P	Avanti Polar Lipids Inc.	57-88-5
Brain Extract Polar	141101C	Avanti Polar Lipids Inc.	86088-88-2
E. coli Total Lipid Extract	100500C	Avanti Polar Lipids Inc.	1240502-50-4
E. coli Polar Lipid Extract	100600C	Avanti Polar Lipids Inc.	1240502-50-4
DDM (n-Dodecyl $\beta$ -D-Maltopyranosid)	D4641	Sigma	69227-93-6
OG (Octylglucosid)	CN23.3	Roth	29836-26-8
<b>Inhibitoren und Entkoppler</b>			
Monensin	M5273	Sigma	22373-78-0
Valinomycin	V0627	Sigma	2001-95-8
Nigericin	N7143	Sigma	28643-80-3
NEM (N-Ethylmaleimid)	E3876	Sigma	128-53-0
Forskolin	11018	Cayman Chemical Company	66575-29-9
Phloretin	14452	Cayman Chemical Company	60-82-2
Phlorizin	11576	Cayman Chemical Company	7061-54-3
<b>Sonstiges</b>			
DISC3(5) (3,3'-Dipropylthiadicarbocyanine iodid)	43608	Sigma	53213-94-8
Pyranin (8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonat)	H1529	Sigma	6358-69-6
DTT (Dithiothreitol)	D0632	Sigma	3483-12-3
D <sub>2</sub> O	617358	Sigma	7789-20-0

## Molekularbiologie und Probenpräparation

## Herstellung der Mutanten

**Vektoren**

Die Vektoren zur Expression der wt Transporter FucP, XylE und GlcP wurden von verschiedenen Laboren zur Verfügung gestellt ([Tabelle 5](#)). Im Falle von wt und E325A LacY wurde direkt das gereinigte Protein bereitgestellt.

**Tabelle 5: Zur Expression der Transporter verwendete Vektoren.**

Transporter	Vektor	Quelle
LacY	pT7-5/wt LacY [149]	Kaback lab
FucP	pBAD-His A/wt FucP, subkloniert aus pET21b [131]	Kaback lab
XylE	pET15b/wt XylE [142]	Yan lab
GlcP	pET15b/wt GlcP [133]	Choe lab

### **Primer-Design und QuikChange PCR**

Zur Herstellung von D46N FucP, D27N XylE und D22N GlcP wurde das QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene verwendet. Im Fall von Q175I/L297F XylE wurden beide Mutationen während derselben QuikChange PCR eingeführt. Die verwendeten Primer sind in [Tabelle 6](#) gelistet.

**Tabelle 6: Übersicht der für die QuikChange PCR verwendeten Primer.** Das die entsprechende Punktmutation einführende Basentriplett ist rot hervorgehoben.

Mutante	Forward Primer	Reverse Primer
D46N FucP	CTGGAATTGAGGTAATAAAATGTTG TTAAGGTTATGGCTACCGC	GCGGTAGCCAATAACCTTAACAACA TTTTATTACCTCAATCCAG
D27N XylE	GGTTTATTATTTGGCTACAACACCG CCGTTATTTCGG	CCGGAAATAACGGCGGTGTTGTAGC CAAATAATAAACC
D22N GlcP	GGGAGCACTTGGTGGCTTATTATAT GGTTATAATAATGGTGTGATTTCCGGTGC	GCACCGGAAATCACACCATTATTAT AACCATATAATAAGCCACCAAGTGCTCCC
Q175I/L297F XylE	GCGATTATTTTCGGGATCCTTTTAG TTTACTGCG	CGCAGTAAACTAAAAGGATCCCGAA AATAATCGC
	CGGCATCAATGGTGTCTTACTAC GCGCCGG	CCGGCGGTAGTAGAACACCACATT GATGCGG

### **Plasmid-Präparation für die Sequenzierung**

Das PCR Produkt wurde nach dem *DpnI*-Verdau für die Transformation in XL1-Blue superkompetente Zellen durch Hitzeschock verwendet. Die Zellen wurden ausplattiert. Nach einer Übernacht-Inkubation bei 37 °C wurden vier Klone für die Anzucht einer 5 ml Flüssigkultur mit Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen isoliert und zwecks Sequenzierung zu MWG Eurofins Operon verschickt.

## **Proteinsynthese**

### **Transformation**

Zur Proteinexpression wurde die Plasmid-DNA für FucP, XylE und GlcP (wt sowie Mutanten) über Hitzeschock in *E.coli* BL21-DE3 Zellen transformiert. Es wurde eine 100 ml Vorkultur in LB-Flüssigmedium (10 g/L Trypton, 10 g/L NaCl, 5 g/L Hefeextrakt, pH 7,0) angesetzt und über Nacht inkubiert (Multitron HT Infors, 120 rpm, 37 °C).

### ***Proteinexpression***

Die Proteinexpression erfolgte im 6 L Maßstab (drei 2 L Kolben mit Schikane) in 2YT Flüssigmedium (16 g/L Trypton, 5 g/L NaCl, 10 g/L Hefeextrakt, pH 7,0) mit 50 µg/ml Ampicillin. Nach Inokulation der Hauptkultur mit drei mal 33 ml Vorkultur und 2 - 4 h Inkubation im Schüttler (Multitron HT Infors, 120 rpm, 37 °C) wird bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 die Proteinexpression induziert. Für FucP-Konstrukte werden 0,02% Arabinose und für XylE- und GlcP-Konstrukte 0,2 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) verwendet. Nach 3 bis 4 Stunden wird die Expression beendet.

### ***Zellernte***

Die Flüssigkultur wird auf sechs 1 L Zentrifugations-Behälter verteilt und in der Beckman J6-MI zentrifugiert (JS 4.2 Rotor, 4.200 rpm, 20 min, 4 °C). Die Pellets werden in 100 ml Puffer (50 mM NaPi, pH 7,5) resuspendiert, auf zwei 50 ml Falcons verteilt und erneut zentrifugiert (Sigma 3-18K Fuge, 4.248 g, 4 °C, 20 min). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### ***Zellaufschluss***

Das Pellet wird aufgetaut und in 100 ml Puffer (50 mM NaPi, pH 7,5, 200 mM NaCl), einer Spatelspitze DNase I (bovine pancreas grade II, Roche) und einer Tablette des Protease-Inhibitor-Cocktails (PIC, c0mplete Tablets EDTA-free EASYpack, Roche) pro 15 g Zelltrockenmasse aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte durch fünf Zyklen am Mikrofluidizer (110-LA, Microfluidics Corporation, 12.000 Psi).

### ***Isolierung der Membranfragmente***

Das Zell-Lysat wird zentrifugiert (Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, DuPont Instruments, SS34 Rotor, 9.500 rpm, 15 min, 4 °C) und der erhaltene Überstand erneut ultrazentrifugiert (Beckman Coulter L-60, Ti 60 Rotor, 1 h, 60.000 rpm, 4 °C), um die MF zu isolieren. Diese werden mittels Kanüle in etwa 10 ml Puffer (50 mM NaPi, pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM Imidazol) pro 15 g Zelltrockengewicht resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

## **Proteinreinigung**

### ***Einstellen der Proteinkonzentration***

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird eine Bradford-Proteinbestimmung mit dem Quick Start Bradford Dye Reagent (BIO-RAD Laboratories Inc.) durchgeführt. Die MF-Suspension wird dann auf eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml durch Verdünnung in Puffer (50 mM NaPi, pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM Imidazol, 1 PIC Tablette pro 50 ml) eingestellt.

### ***Solubilisierung der Membranfragmente***

Die MF-Suspension (5 mg/ml Protein) wird bei 4 °C mit 1 % (w/v) n-Dodecyl  $\beta$ -D-Maltopyranosid (DDM) in Pulverform versetzt und 30 min langsam gerührt. Nach Ultrazentrifugation (Beckman Coulter L-60, Ti60 Rotor, 1 h, 60.000 rpm, 4 °C) wird der Überstand für die Proteinreinigung mittels Ni-NTA Säule verwendet.

### ***Reinigung mit Ni-NTA Säule***

Zur Reinigung der Ausbeute aus 3 L LB-Flüssigmedium wird eine 10 ml BioRad Säule mit 2 ml (Bettvolumen) Ni-NTA Beads (Ni-NTA His-bind Resin, 24 % Ethanol, Novagen) verwendet. Nach Waschen mit 40 ml Wasser und 20 ml Säulenpuffer (50 mM NaPi, pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM Imidazol, eine PIC-Tablette je 50 ml, 0,01 % DDM) erfolgt die Beladung der Säule mit einer Fließgeschwindigkeit von 2 ml/min.

Nach Beladung wird solange mit Säulenpuffer gewaschen bis die OD<sub>280</sub> die Basislinie erreicht hat (ca. 40 ml). Anschließend wird Säulenpuffer mit 30 mM Imidazol zum Waschen verwendet bis die OD<sub>280</sub> die Basislinie erreicht hat (ca. 40 ml). Zuletzt erfolgt die Elution in etwa 10 ml Elutionspuffer (50 mM NaPi, pH 7,5, 200 mM Imidazol, 0,01 % DDM).

### ***Konzentrierung und Pufferaustausch***

Nach Elution wird die Proteinkonzentration über UV-Absorption bei 280 nm am NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer bestimmt. Zur Konzentrationsberechnung wird der für die Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins durch ProtPARAM vorhergesagte Extinktionskoeffizient verwendet [217].

Das Eluat wird in Filtereinheiten (Amicon Ultra Centrifugal Filters, Ultracel-10K, Millipore, 10 kDa *cut-off*) fünfmal durch Zentrifugation (Sigma 3-18K Fuge, 2.900 rpm, 4 °C) auf etwa 1 - 2 ml konzentriert und jeweils mit 15 ml Rekonstitutionspuffer (100 mM KPi, pH 7,6, 2 mM MgSO<sub>4</sub>) verdünnt. Zuletzt wird das Protein auf 2 - 5 mg/ml konzentriert und im Folgenden direkt für die Rekonstitution in Liposomen verwendet.

### ***Protein-Ausbeuten***

Nach der Konzentrierung der Proteine wurden für die verschiedenen Transporter-Varianten die in [Tabelle 7](#) dargestellten Ausbeuten erzielt.

**Tabelle 7: Übersicht der Protein-Ausbeuten nach dem letzten Reinigungsschritt.** \* Die Transporter-Varianten wurden in Zusammenarbeit im Rahmen verschiedener Bachelor Arbeiten (Seite XXIX, Tabelle 30) nach der beschriebenen Methode hergestellt und gereinigt.

Transporter-Variante	Protein / L Kultur
FucP wt	1,7 mg
D46N FucP*	0,9 mg
XylE wt	1,5 mg
D27N XylE	0,25 mg
Q175I/L297F XylE*	0,7 mg
I172A XylE*	0,2 mg
GlcP wt	1,5 mg
D22N GlcP*	0,25 mg
I105S GlcP*	0,4 mg

## Rekonstitution

### *Präformation der Liposomen*

Zur Herstellung von Liposomen werden > 400 µl *natural E. coli lipids polar extract* (25 mg/ml in Chloroform, Avanti Polar Lipids Inc.) am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel getrennt und das Lipid mit > 1 ml Rekonstitutionspuffer (100 mM KPi, pH 7,6, 2 mM MgSO<sub>4</sub>) versetzt (finale Konzentration: 10 mg/ml). Durch 2 min Sonifizieren im Ultraschallwasserbad (Sonorex RK 52 H, Bandelin), 15 min schnellem Schütteln (IKA Vibrax VXR basic, 1.000 rpm) und erneutem Sonifizieren werden die Lipide gelöst und Liposomen gebildet. Teilweise erfolgte hiernach eine Extrusion (400 nm Filter-Porengröße) mittels Liposofast (Avestin Inc., 20 Zyklen). In vielen Fällen wurden die Liposomen direkt nach dem Sonifizieren für die Rekonstitution verwendet.

### *Rekonstitutionsansatz*

Zur Rekonstitution werden auf Eis 10 mg/ml Liposomen mit 1 % Octylglucosid (OG) versetzt. Für eine Rekonstitution bei einer LPR von 5 werden 200 µg Protein pro mg Lipid hinzugegeben, kurz invertiert und anschließend sofort das Detergenz entfernt (siehe unten). Bei der Zugabe von Protein wurde darauf geachtet, dass die Lipidkonzentration des Rekonstitutionsansatzes nicht unter 5 mg/ml fällt. Bei niedrigeren LPRs wurde die Proteinkonzentration entsprechend erhöht.

### *Rekonstitution mit Bio-Beads*

Für die Rekonstitution von FucP, XylE und GlcP (wt und Mutanten) werden Bio-Beads (SM2, BioRad) zum Entfernen der Detergenz-Moleküle verwendet. Bio-Beads werden in Methanol aufgenommen, 5 min inkubiert und anschließend fünfmal mit Wasser gewaschen. Vorbereitete Bio-Beads werden in Wasser bei 4 °C gelagert.

Vor Verwendung werden die Bio-Beads kurz auf einem Papiertuch getrocknet und dann zu etwa 1/3 des Gesamtvolumens (etwa 400 mg/ml) zum Rekonstitutionsansatz gegeben. Die Probe wird bei 4 °C über Nacht unter Schütteln (IKA Vibrax VXR basic, 1.000 rpm) inkubiert. Am folgenden Tag werden die Bio-Beads über eine Filtereinheit (Pierce Spin Cups Paper Filter, Thermo Scientific) und Zentrifugation (Eppendorf Tischzentrifuge, 30 s, 10.000 rpm) entfernt, frische Bio-Beads zugegeben und erneut für eine Stunde unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss werden die Proteoliposomen aliquotiert und bei - 80 °C gelagert.

### ***Rekonstitution durch Verdünnung***

Die Rekonstitution von wt und E325A LacY mit der Bio-Beads-Methode funktionierte nicht. Sie erfolgte daher durch eine Verdünnung des Rekonstitutionsansatzes in 100 ml Puffer (100 mM KPi, pH 7,6, 200 mM NaCl, 1 mM DTT) bei 4 °C durch langsame Zugabe unter langsamen Rühren. Nach Verdünnung wird 10 min weiter gerührt. Anschließend werden die Proteoliposomen über Ultrazentrifugation (Beckman Coulter L-60, Ti60 Rotor, 1 h, 60.000 rpm, 4 °C) pelletiert. Die Pellets werden im selben Puffer resuspendiert, in einem Zentrifugations-Röhrchen gesammelt und erneut ultrazentrifugiert. Die Proteoliposomen werden in Puffer (100 mM KPi, pH 7,6, 1 mM DTT) zu einer finalen Lipidkonzentration von etwa 5 mg/ml aufgenommen, aliquotiert und bei - 80 °C gelagert.

## SSM-basierte Elektrophysiologie

### **Konfiguration der Setups**

In Messungen an der SSM wurden zwei verschiedene Setups verwendet. Das *schnelle* Setup wurde insbesondere für Messungen herangezogen, welche schnelle *pre steady-state* Komponenten auflösen sollten, während das *langsame* Setup für Messungen von *steady-state* Signalen sowie für Messungen unter asymmetrischen pH-Bedingungen verwendet wurde.

Es werden alle transienten Ströme, die direkt miteinander verglichen werden sollen, am selben Setup aufgenommen, insbesondere wenn der Peakstrom sowohl *steady-state* als auch *pre steady-state* Komponenten beinhaltet oder ausschließlich *pre steady-state* Signale gemessen werden.

Die wichtigsten Parameter der zwei Setups sind in [Tabelle 8](#) gegenübergestellt. Insbesondere die Zeitauflösung, der verwendete Druck und die damit verbundene Flussrate zeigen Unterschiede.

Tabelle 8: Übersicht der grundlegenden Parameter der verwendeten SSM Setups.

	langames Setup	schnelles Setup
Küvette	I-Küvette	Y-Küvette
Verstärker	Keithley 427	Keithley 428
Anstiegszeit Verstärker	10 ms	3 ms
Zeitauflösung NA-A-Wechsel	15 ± 3 ms	5 ± 1 ms
Zeitauflösung R-NA-Wechsel	120 ± 20 ms	/
Druck	0,6 bar	0,3 bar
Flussrate	1 ml/s	0,4 ml/s
Verstärkung	10 <sup>9</sup> V/A	
Suppression Verstärker	10 <sup>9</sup>	
Datenpunkte	2000 s <sup>-1</sup>	

### Bestimmung der Zeitauflösung

Ein wesentlicher Unterschied zwischen dem schnellen und dem langsamen Setup liegt in ihrer Zeitauflösung. Diese wurde ermittelt, indem KClO<sub>4</sub>-Sprünge auf der SSM am jeweiligen Setup bei dem entsprechenden Druck durchgeführt wurden. Aufgrund der starken Interaktion von KClO<sub>4</sub> mit den Lipidkopfgruppen der SSM [179] resultieren Artefakte, die durch die Zeitauflösung des Systems limitiert sind (Abbildung 14). Ein Fit der Peak-Integrale mit einer empirischen Funktion (Gleichung G24) ergibt τ als Zeitauflösung des jeweiligen Setups.

$$Q(t) = Q_0 \cdot \frac{(t - t_0)^3}{(t - t_0)^3 + \tau^3} \tag{G24}$$

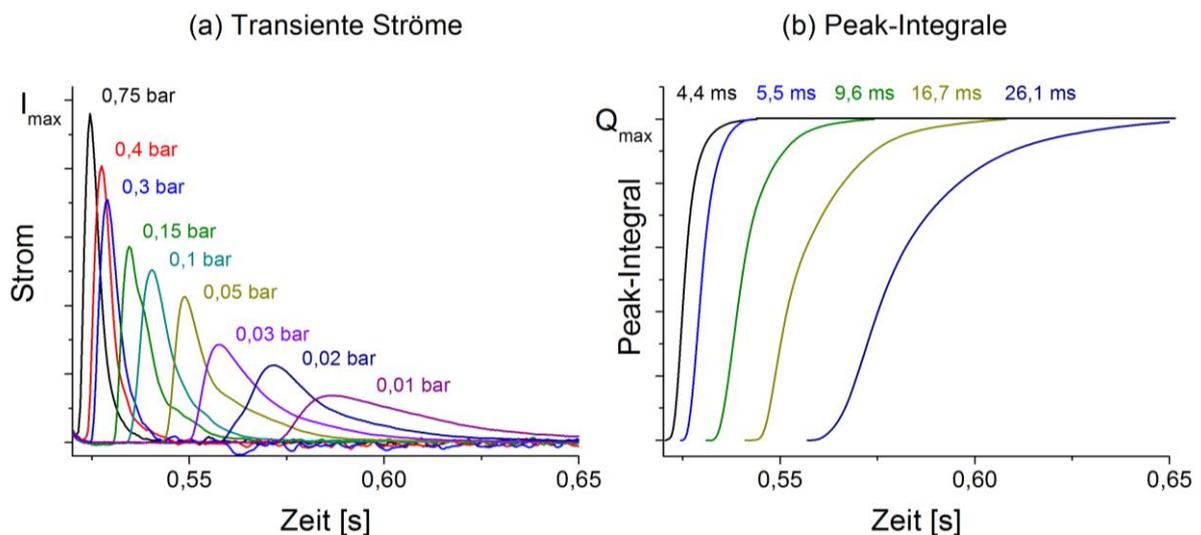


Abbildung 14: Bestimmung der Zeitauflösung mittels KClO<sub>4</sub>-Sprüngen am schnellen Setup. Analog dazu wurden auch die in Tabelle 8 angegebenen Zeitaufösungen für das langsame Setup bestimmt. (a) Transiente Ströme nach dem NA-A-Lösungswechsel (30 mM KCl gegen 30 mM KClO<sub>4</sub>) in Abhängigkeit vom Druck. Alle Lösungen enthalten 100 mM KPi bei pH 7,5. (b) Die Integrale der Peaks in (a) wurden auf Q<sub>max</sub> normiert und eine Auswahl mit Angabe der Zeitauflösung dargestellt. Die Zeitauflösung wurde aus einem Fit mit Gleichung G24 erhalten.

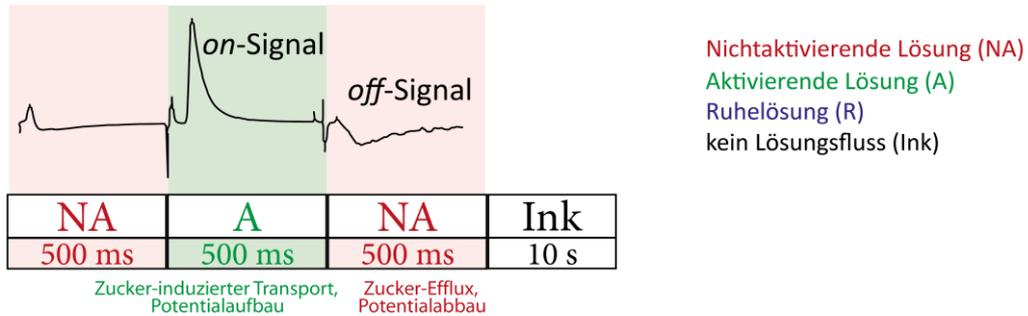
### **Flussprotokolle**

In der vorliegenden Arbeit werden einfache Lösungswechsel- und Doppellösungswechsel-Flussprotokolle angewendet. In Messungen ohne pH-Gradienten über der PM wird ein einfacher Lösungswechsel verwendet ([Abbildung 15a](#)). Nach dem Fluss der nichtaktivierenden (NA) Lösung erfolgt der Lösungswechsel zur aktivierenden (A) Lösung, die das Transporter-Substrat enthält und den Protonen-gekoppelten Transport aktiviert. Der resultierende Messstrom wird aufgezeichnet. Es folgt erneut ein Fluss der NA-Lösung, sodass der Zucker entlang seines Gradienten aus dem Proteoliposom heraus transportiert wird und die Ausgangsbedingungen wieder hergestellt sind. Im schnellen Setups erfolgt bedingt durch die Ventilkonfiguration (siehe [unten](#)) nach der ersten NA-Flusszeit eine Wartezeit von 10 ms vor Beginn des A-Flusses.

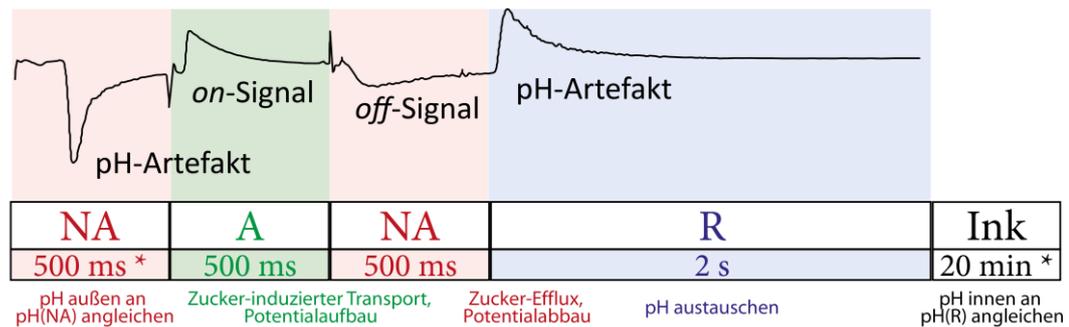
Zur Messung unter asymmetrischen pH-Bedingungen, d.h. unterschiedlichen pH-Werten außerhalb und innerhalb des Proteoliposoms, wird ein doppelter Lösungswechsel benötigt ([Abbildung 15b](#)). Nach dem zweiten NA-Fluss im einfachen Lösungswechsel-Flussprotokoll folgt ein Fluss der Ruhelösung (R), die den pH-Wert in der Küvette auf den pH-Wert der R-Lösung, also pH(R) bringt. Während der folgenden Inkubationszeit (3 - 20 Minuten) gleicht sich der intraliposomale pH-Wert an pH(R) an. Zu Beginn des nächsten Experiments fließt die NA-Lösung mit pH(NA) und etabliert einen pH-Gradienten, wobei der pH-Wert außen ungefähr pH(NA) und der pH-Wert innen ungefähr pH(R) entsprechen. Nach etwa 500 ms ist der äußere pH-Wert ausgetauscht und der Substratsprung kann mit dem Wechsel zur A-Lösung stattfinden. Dieser Lösungswechsel induziert dann die Transporter-Aktivität unter asymmetrischen pH-Bedingungen. Der resultierende Messstrom wird aufgezeichnet. Es folgt ein erneuter Fluss der NA-Lösung, gefolgt von der erneuten Einstellung des inneren pH-Wertes über Fluss und Inkubation mit R-Lösung.

Um die Stabilität der pH-Gradienten und die Abhängigkeit der Transporter-Aktivität vom inneren pH-Wert zu überprüfen, wurden Messungen mit dem Doppellösungswechsel-Flussprotokoll, aber unterschiedlichen NA-Zeiten von 500 ms bis 20 Minuten verwendet (ab 4 s NA-Fluss folgt dem NA-Fluss eine entsprechende Inkubationszeit in NA-Lösung). Innerhalb dieses ersten NA-Flusses erfolgt bereits die Änderung des inneren pH-Wertes von pH(R) in Richtung pH(NA), sodass sich der Transporter-Strom bei Abhängigkeit vom inneren pH-Wert ebenfalls mit der NA-Zeit ändert ([Seite 111, Abbildung 38](#)). Diese Messungen zeigen, dass bereits bei kurzen NA-Zeiten der Peak-Strom stark von der NA-Zeit abhängig ist. Der intraliposomale pH-Wert gleicht sich schnell an pH(NA) an, sodass bei Messungen mit pH-Gradienten der pH(R)-Wert nicht mit dem intraliposomalen pH-Wert gleichgesetzt werden darf. Für Gradientenmessungen wurden aufgrund dieser Problematik die niedrigste mögliche NA-Zeit von 500 ms verwendet. Geringere NA-Zeiten sind aufgrund des pH-Austauschartefakts nicht möglich ([Abbildung 15b](#)).

(a) Einfacher Lösungswechsel (Messungen bei symmetrischem pH-Wert)



(b) Doppelter Lösungswechsel (Messungen mit pH-Gradienten)

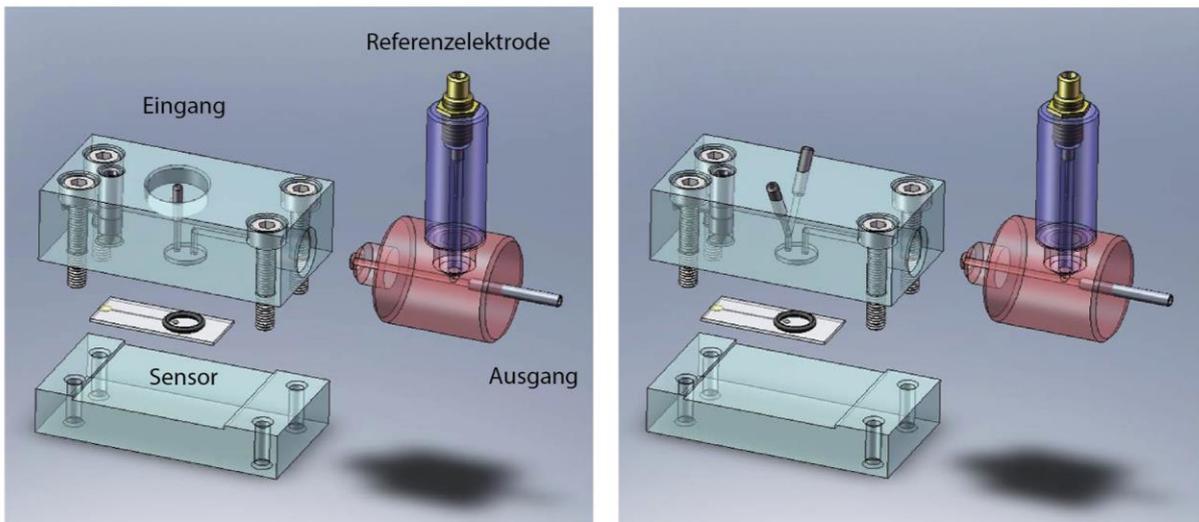


**Abbildung 15: Übersicht über die verwendeten Flussprotokolle.** (a) Das einfache Lösungswechsel-Flussprotokoll wurde für alle pH-symmetrischen Messungen verwendet, d.h. wenn intraliposomale und extraliposomale pH-Werte identisch sind. Beim schnellen Setup folgt dem ersten NA-Fluss eine Wartezeit von 10 ms, bevor der A-Fluss beginnt. (b) Das Doppellösungswechsel-Flussprotokoll wurde für pH-asymmetrische Messungen verwendet, bei denen die Transporter-Aktivität unter Einfluss eines pH-Gradienten untersucht werden soll. \* Die NA-Zeit wurde in Experimenten variiert, welche die Stabilität des pH-Gradienten überprüfen sollen (Seite 111, Abbildung 38). \* Die Inkubationszeit in R-Lösung wurde je nach pH-Gradient zwischen 3 und 20 Minuten gewählt.

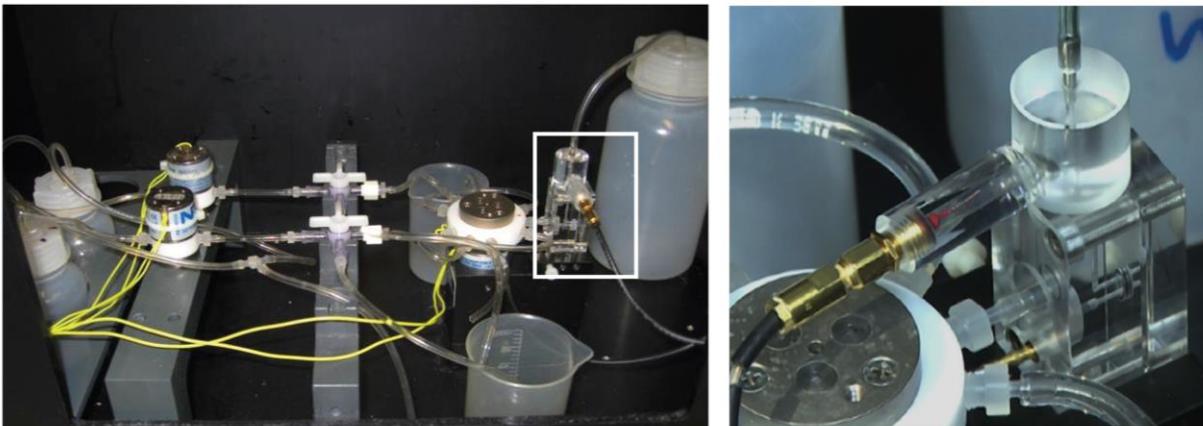
### Ventilkonfiguration und Küvetten

Im schnellen Setup sind zwei 2-Wege-Ventile (V2, NResearch NR225T011) verbaut, die getrennt den Fluss der NA- und A-Lösung kontrollieren. Weil die Ventilschließungszeiten nicht genau definiert sind und um den gleichzeitigen Fluss beider Lösungen zu verhindern, ist die oben genannte Zeitspanne von 10 ms ohne Lösungsfluss eingefügt. Die im schnellen Setup verbaute Küvette hat entsprechend zwei Eingänge (Abbildung 16a), einen für die A-Lösung und einen für die NA-Lösung. Der Lösungswechsel erfolgt ca. 5 mm vor dem Sensor, was die verbesserte Zeitauflösung ermöglicht. Im langsamen Setup sind die 2-Wege-Ventile (V2) mit demselben Controller verbunden und werden gleichzeitig geöffnet (Abbildung 16b,c). Durch die Schaltung eines terminalen Ventils (Vt, NResearch NR225T031), wird der Fluss der A- und NA-Lösungen so umgeleitet, dass die A-Lösung zur Küvette und die NA-Lösung in einen Ausschussbehälter geleitet werden. Ist das terminale Ventil inaktiv, fließen A-Lösung zum Ausschussbehälter und NA-Lösung zur Küvette. Der Küvetten-Eingang ist direkt am terminalen Ventil über ein etwa 1 cm langes Verbindungsstück angeschlossen. Für Messungen unter asymmetrischen pH-Bedingungen (Abbildung 15b) ist zusätzlich ein 3-Wege-Ventil (V3, NResearch NR360T331) zwischen dem NA-Fluss-kontrollierenden 2-Wege-Ventil und dem terminalen Ventil verbaut, das bei Aktivierung vom Fluss der NA-Lösung zum Fluss der R-Lösung wechselt.

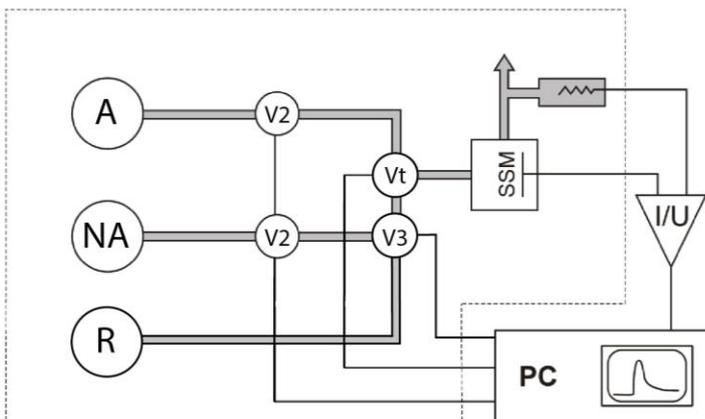
(a) Küvetten des langsamen und schnellen Setups



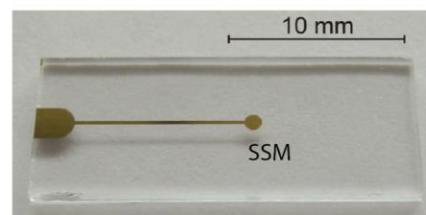
(b) Schlauch-Ventil-System des langsamen Setups mit eingebauter Küvette



(c) Schematischer Aufbau des langsamen Setups



(d) Sensor mit Goldelektrode



**Abbildung 16: Küvetten und Ventilkonfiguration der SSM-Setups.** (a) Links ist die Küvette des langsamen Setups mit einem einzelnen Küvetten-Eingang, rechts die des schnellen Setups mit separaten Eingängen für die NA- und A-Lösung gezeigt. Die Referenzelektrode ist an eine Referenzspannungsquelle angeschlossen und über eine Gelbrücke mit dem Lösungsfluss verbunden. (b) Foto des langsamen Setups in der Konfiguration für den einfachen Lösungswechsel ohne R-Lösung. Rechts ist die eingebaute Küvette zu sehen. (c) Der schematische Aufbau des langsamen Setups in der Konfiguration für den doppelten Lösungswechsel mit R-Lösung. Verändert nach Schulz et al. [201] (d) Foto des Sensors mit zentraler, kreisrunder Sensorfläche, auf der die SSM assembliert wird. Der Kontaktpad links ist mit dem Verstärker verbunden. Eine nähere Beschreibung ist im Haupttext gegeben.

## Vorbereitung des Setups

### ***Regenerierung der Gelbrücke und Referenzelektrode***

Die Gelbrücke stellt die elektrische Verbindung zwischen Referenzelektrode und Sensor her. Referenzelektrode und Gelbrücke müssen regelmäßig erneuert werden. Die Gelbrücke enthält 40  $\mu\text{l}$  eines Polyacrylamid-Gels (100 mM KPi, pH 7,5, 100 mM KCl, 6 % Acrylamid, 0,3 % APS, 0,6 % TEMED) und wird bei 4 °C in Puffer (100 mM KPi, pH 7,5, 100 mM KCl) gelagert. Zur Regenerierung der Silber-Chlorid-Elektrode wird das restliche Chlorid mit feinem Schleifpapier entfernt. Der Silberdraht wird dann in 1 M HCl für 15 min bei 0,5 mA chloriert.

### ***Herstellung des SSM-Lipids***

Zur Herstellung des SSM-Lipids wird Diphytanoyl-Phosphatidylcholin (DiPhyPC, 20 mg/ml in Chloroform, Avanti Polar Lipids Inc.) mit 1:60 (w/w) Octadecylamin am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel getrennt. Das Lipidgemisch wird zu 15 mg/ml in n-Decan gelöst und bei -20 °C gelagert.

### ***Vorbereitung des Schlauch-Ventil-Systems***

Das Schlauch-Ventil-System des Setups ist bei Nichtgebrauch mit einem Gemisch aus 30 % Ethanol und 70 % Wasser befüllt. Vor Einbau des Sensors wird das System nacheinander mit jeweils ca. 50 ml des Ethanol/Wasser-Gemischs, ddH<sub>2</sub>O und 100 mM KPi (pH 7,6) bei ca. 0,6 bar (langames Setup) bzw. 0,3 bar (schnelles Setup) gespült und von Luftblasen im Schlauchsystem frei gemacht.

### ***Vorbereitung des Sensors***

Der Sensor wird in 10 mM Octadecanthiol-Lösung (in Ethanol) gelagert und vor Verwendung mit Ethanol gewaschen und unter Stickstoffbegasung getrocknet. Auf die aktive Gold-Oberfläche werden dann 0,5  $\mu\text{l}$  SSM-Lipid pipettiert und der Sensor-Chip in die Küvette eingebaut. Nach Einbau wird der Sensor sofort mit Puffer (100 mM KPi, pH 7,6) gespült, wodurch die SSM assembliert.

Insbesondere beim schnellen Setup ist darauf zu achten, dass beim Zusammenbau der Sensor direkt unter dem Lösungseingang der Küvette platziert wird, weil sich sonst die Zeitauflösung und damit schnelle *pre steady-state* Ströme erheblich unterscheiden können.

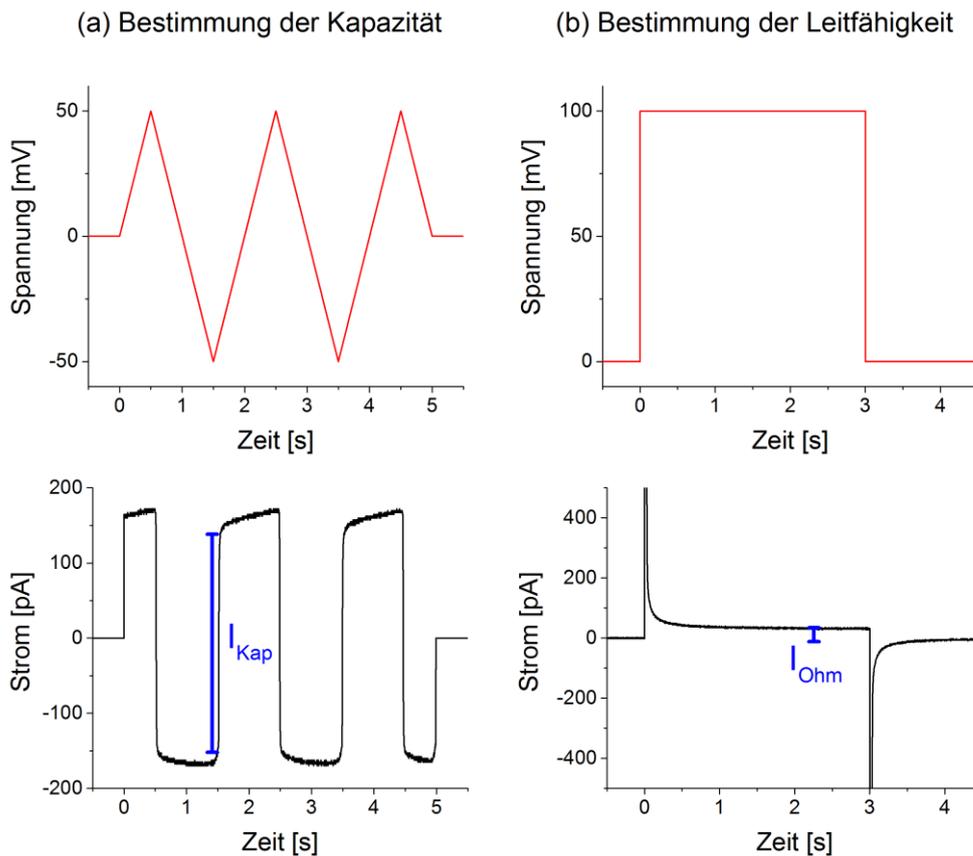
### ***Bestimmung der Membran-Parameter***

Die Leitfähigkeit und Kapazität der SSM wird durch Anlegen einer Gleichspannung von  $U = 100 \text{ mV}$  bzw. einer Dreiecksspannung von  $dU = 50 \text{ mV}$  bestimmt ([Abbildung 17](#)). Dabei wird der Ohm'sche Strom  $I_{\text{Ohm}}$  bzw. der kapazitive Strom  $I_{\text{kap}}$  abgelesen und für die Berechnung der Leitfähigkeit ([Gleichung G25](#)) und Kapazität ([Gleichung G26](#)) verwendet. Eine nähere Betrachtung von Leitfähigkeit und Kapazität einer Membran findet sich auf [Seite 2f](#). Richtwerte für die Leitfähigkeit und Kapazität

einer SSM sind  $g < 0,5 \text{ nS}$  bzw.  $1,0 < C < 4,0 \text{ nF}$ . Weichen die Membranparameter von diesen Richtwerten ab, wird der Sensor regeneriert und eine neue Membran vorbereitet.

$$g = \frac{I_{\text{Ohm}}}{U} \quad \text{G25}$$

$$C = I_{\text{Kap}} \cdot \frac{dt}{2 \cdot dU} \quad \text{G26}$$



**Abbildung 17: Exemplarische Messungen zur Bestimmung der Kapazität und der Leitfähigkeit einer SSM.** Die angelegte Spannung ist jeweils in rot, der Antwortstrom in schwarz dargestellt. An der blauen Markierung wird der kapazitive bzw. Ohm'sche Strom abgelesen, der zur Berechnung der Kapazität bzw. Leitfähigkeit mit [Gleichung G25](#) und [Gleichung G26](#) verwendet wird. (a) Wenn sich die angelegte Spannung mit einer konstanten positiven Steigung ändert, fließt ein konstanter Strom in den Kondensator. Sobald sich das Vorzeichen der Steigung ändert, entlädt sich der Kondensator um denselben Strombetrag. Der kapazitive Strom ist hier als Differenz zwischen Lade- und Entladestrom definiert. (b) Wird dagegen die Spannung abrupt auf einen konstanten Wert angelegt, fließt zunächst ein maximaler Ladestrom. Dieser klingt mit der Zeit exponentiell ab, bis der Kondensator vollständig geladen ist und ausschließlich ein konstanter Strom über den Widerstand der Membran fließt.

### Zugabe von Proteoliposomen

Vor Zugabe der Proteoliposomen wird der erste Messpuffer mit pH 7,5 eingebaut und das System gespült. Ein  $30 \mu\text{l}$  Aliquot Proteoliposomen wird aufgetaut, durch Verdünnung mit Rekonstitutionspuffer auf  $2,5 \text{ mg/ml}$  Lipid eingestellt und vier bis fünf Mal mit kurzen Pausen auf Eis für etwa  $20 \text{ s}$  im Ultraschallwasserbad (Sonorex RK 52 H, Bandelin) sonifiziert, sodass unilamellare

Proteoliposomen mit einem Durchmesser von weniger als 100 nm entstehen [218]. Die Zugabe der Proteoliposomen (30 µl) erfolgt über den Ausgang der Küvette. Es folgt die Adsorption an die SSM während 1 bis 2 h Inkubation.

## **Ablauf der Messungen**

### ***Vorbereitung der Messpuffer***

Insbesondere Zucker-haltige Messpuffer werden bei 4 °C gelagert und werden vor den Messungen im Wasserbad (LAUDA ecoline RE207) auf Raumtemperatur gebracht. Dithiothreitol- (DTT-), Monensin- und Inhibitor-haltige Messpuffer werden maximal 5 Tage verwendet. Zucker-haltige Messpuffer sind 2 Wochen haltbar.

### ***Einzelmessungen***

Unter symmetrischen pH-Bedingungen werden für jede Pufferkombination drei bis sechs Einzelmessungen im Abstand von 10 s durchgeführt. Unter asymmetrischen pH-Bedingungen werden ein bis zwei Einzelmessungen pro Sensor durchgeführt, da die Wartezeit nach jeder Messung im Minutenbereich liegt (Seite 47, Abbildung 15).

### ***Rundown-Kontrolle***

Vor Beginn der Messreihe werden Messungen unter sättigenden Bedingungen im Abstand von 3 min solange wiederholt, bis sich das Signal stabilisiert hat. Unter denselben Bedingungen wird die Messung nach Beenden der Messreihe wiederholt, um die Signal-Stabilität während des Experiments beurteilen zu können. Eine Signalveränderung von bis zu 10 % bei einem Messzeitraum von 1 h liegt im Rahmen üblicher Schwankungen. Werden Abweichungen von über 20 % detektiert, wird die Messreihe verworfen.

### ***Inkubationszeiten nach Pufferwechsel***

Bei Messreihen mit verschiedenen pH-Werten beginnt die Messreihe am basischen Ende, weil die Änderung des intraliposomalen pH-Wertes wesentlich schneller erfolgt, wenn die pH-Änderung vom Basischen zum Sauren hin stattfindet (Seite 93, Abbildung 31). Nach dem Pufferwechsel wird viermal mit dem einfachen Lösungswechsel-Flussprotokoll gespült und 3 min inkubiert, damit sich der intraliposomale pH-Wert angleicht, bevor das Signal zur Auswertung aufgezeichnet wird. Nach Wechsel zu D<sub>2</sub>O-haltiger Lösung wird 3 min inkubiert. Die Inkubationszeiten nach Wechsel zu Monensin- oder Inhibitor-haltigem Puffer beträgt 20 bis 30 min.

## **Herstellung der Messpuffer**

### ***Herstellung des Grundpuffers***

Als Grundpuffer wird in allen SSM-Messungen 100 mM Kaliumphosphat (KPi) Puffer verwendet. Zwischen pH 5 und 9 erfolgt die Einstellung des pH-Wertes durch Mischen steril filtrierter 1 M Stocklösungen von  $K_2HPO_4$  und  $KH_2PO_4$  und anschließender Verdünnung auf 100 mM. Die pH-Werte außerhalb des genannten pH- Bereichs werden durch Titration der verdünnten Stocklösungen mit  $H_3PO_4$  bzw. KOH am pH-Meter (765 Calimatic, Knick mit Hamilton Minitrode) eingestellt. Bei Messungen mit  $D_2O$  wird der KPi-Grundpuffer mit 99 %  $D_2O$  statt  $H_2O$  hergestellt.

### ***Zusätze im Grundpuffer***

Für alle Messungen an LacY wird 1 mM DTT dem Grundpuffer zugegeben. Bei Monensin-Kontrollen wird Monensin zu einer Konzentration von 10  $\mu$ M zugesetzt. Nach Beenden einer Messreihe und der *Rundown*-Kontrolle kann die Transportaktivität zur Kontrolle mit spezifischen Inhibitoren blockiert werden. Für GlcP wurden Forskolin, Phloretin und Phlorizin als Inhibitoren getestet, indem im Anschluss der Messungen 10  $\mu$ M Inhibitor zu allen Lösungen hinzugefügt wurde.

### ***Herstellung von NA- und A-Lösung***

NA- und A-Lösungen werden aus demselben Grundpuffer hergestellt, um pH-Artefakte zu vermeiden. In die A-Lösung wird die entsprechende Menge Zucker-Substrat zugefügt, entweder auf Basis einer Stocklösung (bis zu einer Verdünnung des Grundpuffers von 1 %) oder bei hohen Konzentrationen durch Einwaage. Für LacY werden bei Substratkonzentrationen von 100 mM in der NA-Lösung dieselbe Konzentration an D-Glucose verwendet, um das osmotische Potential der A- und NA-Lösungen gleich zu halten (für FucP und XylE wurde auf ein kompensierendes Substrat in der NA-Lösung verzichtet, da aufgrund der niedrigeren  $K_M$ -Werte Messungen mit maximal 30 mM Substrat notwendig waren). Wenn nicht anders angegeben, wurde als Messpuffer folgende Zusammensetzung gewählt: 100 mM KPi bei pH 7,5 mit 30 mM Zucker-Substrat (für FucP, XylE, GlcP) bzw. 100 mM Zucker-Substrat (für LacY).

## **Auswertung der SSM-Signale und Bestimmung der Parameter**

### ***Rundown-Korrekturen***

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Messreihen verwendet, die ein *Rundown* von weniger als 15 % aufweisen. Dieser *Rundown* wurde nicht korrigiert.

## Bestimmung von Peakstrom, Ladungsverschiebung und Abklingzeit

Nachdem die transienten Ströme von drei bis sechs Einzelmessungen am selben Sensor gemittelt wurden, wird die Basislinie auf den Nullstrom translatiert. Als Basislinie wird beim schnellen Setup meist der Strom am Ende des ersten NA-Flusses, beim langsamen Setup meist der Strom zu Beginn des A-Flusses verwendet. Der Peakstrom  $I_p$  wird dann als der maximale Stromwert während des Flusses der A-Lösung abgelesen. Die Abklingzeiten  $\tau_2$  werden aus einem monoexponentiellen Fit des abfallenden Stroms erhalten, wobei das Fitintervall so gewählt wird, dass weder der Peakstrom noch die Basislinie den Fit beeinträchtigen. Die Ladungsverschiebungen  $Q$  werden durch Integration des Peaks bestimmt. Dabei wird gegebenenfalls die Basislinie des transienten Stroms so neu definiert, dass am Ende des A-Flusses der Strom den Nullwert erreicht.

## Darstellung von transienten Strömen

Jeder unter symmetrischen pH-Bedingungen erhaltene, in dieser Arbeit dargestellte transiente Strom stellt einen Mittelwert aus drei bis sechs einzelnen Messungen am selben Sensor dar. Transiente Ströme aus Messungen unter asymmetrischen pH-Bedingungen stellen Einzelmessungen dar. Es handelt sich bei allen transienten Strömen um repräsentative Ergebnisse, die an mindestens drei verschiedenen Sensoren reproduziert wurden. Alle im selben Graphen dargestellten transienten Ströme wurden am selben Sensor aufgezeichnet, um eine direkte Vergleichbarkeit der Peakströme zu ermöglichen. Bei verschiedenen Sensoren ergeben sich unterschiedliche Peakströme, weil sich die Adsorptionseffizienz verschiedener Proteoliposomen-Präparationen von Sensor zu Sensor unterscheiden kann.

## Bestimmung von KD- und KM-Werten

Zur Bestimmung des KM-Wertes wird die Reaktionsfolge in [Gleichung G27](#) zugrunde gelegt. Die Herleitung basiert auf den Überlegungen zur Enzymkatalyse von Michaelis und Menten [\[212\]](#). Dabei erfolgt die extrazelluläre Bindung des Substrats  $S$  mit der Gleichgewichtskonstante  $K_S$  an den Transporter  $P$  unter Bildung des Transporter-Substrat-Komplexes  $PS$ . Außerdem erfolgt in diesem Modell die intrazelluläre Freisetzung des Substrats mit der für die Gesamtreaktion ratenlimitierenden Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  und die erneute Substratbindung innen mit einer geringen, zu vernachlässigenden Ratenkonstante. Unter diesen Voraussetzungen lässt sich die Zerfallsrate von  $PS$  mit [Gleichung G28](#) beschreiben.



$$\text{mit } K_S = \frac{k_1^-}{k_1^+} \text{ und } c_{P0} = c_P + c_{PS}$$

$$\frac{dc_{PS}}{dt} = k_1^+ c_P c_{S_{\text{out}}} - k_1^- c_{PS} - k_2 c_{PS} \quad \text{G28}$$

$K_S$ : Halbsättigungskonzentration der PS-Bildung;  $k_1^{+/-}$ : Ratenkonstante der Vorwärts- (+) bzw. Rückwärts- (-) Reaktion der PS-Bildung;  $k_2$ : Ratenkonstante der Substratfreisetzung;  $c_x$ : Konzentration von x

Michaelis und Menten haben in ihrer ursprünglichen Analyse ein Gleichgewicht für die Substratbindung angenommen (*Gleichung G29*). Wird die Unbekannte  $c_P$  durch das Einführen der Gesamt-Transporter-Konzentration  $c_{P0}$  eliminiert, ergibt sich die Michaelis-Menten Gleichung. Sie enthält hier die Dissoziationskonstante  $K_S$ .

$$k_1^+ c_P c_{S_{\text{out}}} = k_1^- c_{PS} \leftrightarrow c_{PS} = c_{P0} \cdot \frac{c_{S_{\text{out}}}}{K_S + c_{S_{\text{out}}}} \quad \text{G29}$$

Briggs et al. führten die Überlegungen von Michaelis und Menten fort [219]. Ihre Annahme war ein quasistationärer Zustand (*steady-state*), in dem die Konzentration von PS konstant ist. Dies ist dann der Fall, wenn  $c_{S_{\text{out}}} > c_{P0}$  und  $k_2$  ratenlimitierend für die Gesamtreaktion ist. Unter diesen Voraussetzungen ergibt sich aus der Differentialgleichung eine einfache Beziehung, in der die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten zur Michaelis Menten Konstanten  $K_M$  zusammengefasst werden (*Gleichung G30*). Die Unbekannten  $c_{PS}$  und  $c_{P0}$  können durch Einsetzen der Geschwindigkeiten  $v$  und  $v_{\text{max}}$  eliminiert werden, sodass die bekanntere Form der Michaelis-Menten Gleichung erhalten wird (*Gleichung G31*).

$$\frac{dc_{PS}}{dt} = 0 \leftrightarrow k_1^+ c_P c_{S_{\text{out}}} = k_1^- c_{PS} + k_2 c_{PS} \leftrightarrow c_{PS} = c_{P0} \cdot \frac{c_{S_{\text{out}}}}{K_M + c_{S_{\text{out}}}} \quad \text{G30}$$

$$\text{mit } K_M = \frac{k_1^- + k_2}{k_1^+}$$

$$v = \frac{dc_{S_{\text{in}}}}{dt} = k_2 c_{PS} \leftrightarrow c_{PS} = v/k_2$$

$$\lim_{c_S \gg K_S} v = v_{\text{max}} = k_2 c_{P0} \leftrightarrow c_{P0} = v_{\text{max}}/k_2$$

$$v = v_{\text{max}} \cdot \frac{c_{S_{\text{out}}}}{K_M + c_{S_{\text{out}}}} \quad \text{G31}$$

Im elektrophysiologischen Experiment ist die Geschwindigkeit  $v$  gegeben durch den Transporterstrom  $I_p$ . So ergibt sich *Gleichung G32* für die Anpassung der Substrat-Abhängigkeit. In seltenen Fällen wurde aufgrund des Kurvenverlaufs auch der Hill-Fit verwendet (*Gleichung G33*).

$$I_P = I_{\max} \cdot \frac{c_{S_{\text{out}}}}{K_M + c_{S_{\text{out}}}} \quad \text{G32}$$

$$I_P = I_{\max} \cdot \frac{c_{S_{\text{out}}}^n}{K_M^n + c_{S_{\text{out}}}^n} \quad \text{G33}$$

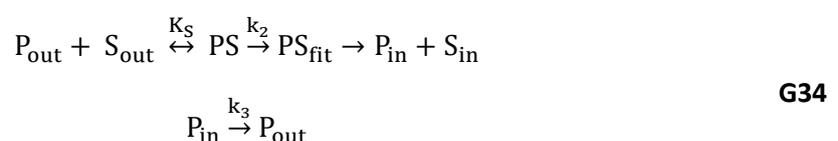
Nach dem Fit einer Messreihe mit [Gleichung G32](#) wurde der Datensatz auf  $v_{\max}$  normiert, damit die Schwankungen der absoluten Peakströme (variierende Adsorptionseffizienz) in den verschiedenen Datensätzen keinen Einfluss auf die Mittelwerte haben. Mindestens drei normierte Datensätze wurden dann gemittelt. Die gemittelten Werte wurden erneut ohne Gewichtung hyperbolisch angepasst und der KM-Wert bestimmt. Dasselbe Verfahren wurde auch für die *pre steady-state* Peakströme verwendet. Die sich ergebende Halbsättigungskonstante ist dann der KD-Wert.

### Relation zwischen KS-, KD- und KM-Werten

In der vorliegenden Arbeit werden bezüglich der Zucker-Substrate drei Halbsättigungskonzentrationen voneinander unterschieden.

1. Der KS-Wert beschreibt die Gleichgewichtskonstante der Zuckerbindungsreaktion wie sie im kinetischen Modell verwendet wird ([Seite 61, Abbildung 18](#)).
2. Der KD-Wert beschreibt die Halbsättigungskonzentration einer der Zuckerbindung folgenden *pre steady-state* Reaktion. Es handelt sich um die experimentell bestimmte Gleichgewichtskonstante der Zuckerbindung. Der KD-Wert kann auch abhängig sein von einem vorgelagerten Gleichgewicht ([Seite 58, Gleichung G45](#)).
3. Der KM-Wert beschreibt die apparente Halbsättigungskonzentration des stationären Transports. Er wird analog zum *steady-state* Formalismus in der Enzymkinetik verwendet. Der KM-Wert ist abhängig vom KD-Wert und der ratenlimitierenden Reaktion im Transportzyklus.

Die mittels [Gleichung G32](#) ermittelten apparenten Gleichgewichtskonstanten KD und KM können eine Folge anderer ratenlimitierender Reaktionen im Transportzyklus sein und von der eigentlichen Gleichgewichtskonstanten KS abweichen. Um den Unterschied zwischen KM- und KD-Werten und deren Relation zum KS-Wert zu verstehen, muss ein im Vergleich zu [Gleichung G27](#) komplexeres Transportmodell betrachtet werden ([Gleichung G34](#)).



Die *pre steady-state* Peakströme der OE-Mutanten repräsentieren den elektrogenen *induced fit* des Zuckermoleküls ([Seite 76, Abbildung 24](#); [Seite 171, Abbildung 56](#)), der direkt auf die Zuckerbindung folgt und mit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten  $k_2$  stattfindet. Wird also nur der Teil der Reaktion in [Gleichung G34](#) bis  $PS_{fit}$  betrachtet, muss nach Michaelis und Menten die apparente Halbsättigungskonstante für die *pre steady-state* Reaktion größer als die Gleichgewichtskonstante sein. Es gilt  $K_D > K_S$  ([Gleichung G35](#)). Mit der Annahme, dass der *induced fit* viel langsamer ist als die Bindungsreaktion selbst ergibt sich der Michaelis-Menten-Spezialfall und der  $K_D$ -Wert entspricht dem  $K_S$ -Wert ([Gleichung G36](#)). Diese Annahme basiert darauf, dass Bindungsreaktionen *per se* sehr schnell sind. Es muss jedoch angemerkt werden, dass auch die *pre steady-state* Signale für alle Transporter sehr hohe effektive Raten von bis zu  $> 300 \text{ s}^{-1}$  aufweisen, die meistens durch die Zeitauflösung des Systems limitiert sind ([Seite 107, Tabelle 20](#); [Seite 88, Abbildung 29](#)).

$$K_D = \frac{k_1^- + k_2}{k_1^+} = K_S + \frac{k_2}{k_1^+}, \quad K_D > K_S \quad \text{G35}$$

$$k_2 < k_1^+ \rightarrow K_D \approx K_S \quad \text{G36}$$

Als *steady-state* Peakstrom wird die elektrogene, ratenlimitierende Konformationsänderung des leeren Carriers detektiert ([Seite 165, Abbildung 55](#)). Der  $K_M$ -Wert entspricht nur dann dem  $K_D$ -Wert, wenn im *steady-state* die *pre steady-state* Reaktion ( $k_2$ ) ratenlimitierend ist. Ist wie angenommen eine spätere Reaktion ( $k_3$ ) ratenlimitierend, muss  $K_M < K_D$  sein ([Gleichung G37](#)). Der *steady-state* wird früher gesättigt als die *pre steady-state* Reaktion. Das Edukt der ratenlimitierenden Reaktion akkumuliert, sodass diese schon bei Substratkonzentrationen gesättigt ist, die unterhalb der Sättigungskonzentration der Bindung liegen.

$$k_3 < k_2 \rightarrow K_M < K_D \quad \text{G37}$$

Zusammengefasst ist in dem zugrunde liegenden Modell der apparente  $K_D$ -Wert der Zuckerbindung immer größer als die Halbsättigung im *steady-state* ( $K_M$ ) und auch immer größer als die tatsächliche Gleichgewichtskonstante ( $K_S$ ). Die Bedeutung der *steady-state* und *pre steady-state* Ströme ist ausführlich in der Diskussion auf [Seite 155f](#) beschrieben.

### Bestimmung der pK-Werte mittels Titrationsgleichung

Jeder Datensatz wird auf den Datenpunkt mit dem größten Peakstrom normiert und mindestens drei Datensätze gemittelt. Zur Bestimmung des pK-Werts für stationären Zucker-Transport wird die pH-Abhängigkeit der gemittelten Peakströme mit einer Titrationsgleichung gefittet. Diese ergibt sich aus der Annahme, dass die Protonierungs- und Deprotonierungs-Reaktionen als schnelles

Gleichgewicht betrachtet wird (*Gleichung G38*). So ergibt sich die Fit-Gleichung für die pH-Abhängigkeit der Peakströme (*Gleichung G39*).



$$\text{mit } K_H = \frac{c_P \cdot c_H}{c_{PH}} = 10^{-pK}, \quad c_{P0} = c_P + c_{PH} \quad \text{und} \quad c_H = 10^{-pH}$$

$$10^{-pK} = \frac{c_P \cdot 10^{-pH}}{c_{PH}} \leftrightarrow c_{PH} = c_P \cdot 10^{-pH+pK} = (c_{P0} - c_{PH}) \cdot 10^{-pH+pK}$$

$$\rightarrow c_{PH} = \frac{c_{P0}}{1 + 10^{pH-pK}}$$

$$I_P = \frac{I_{\max}}{1 + 10^{pH-pK}} \quad \text{G39}$$

Abhängig davon, ob die Protonierung (im Sauren) oder Deprotonierung (im Basischen) beobachtet wird, erfolgt der Fit der pH-abhängigen Peakströme mit *Gleichung G40* oder *G41*. Zur Bestimmung des pK-Wertes der Zuckerbindung an GlcP wird die Titrationsgleichung für die Inhibition im Basischen verwendet und um einen zusätzlichen Parameter  $I_{\min}$  erweitert (*Gleichung G42*), weil im Basischen die Ladungsverschiebung nicht null wird. Für den Fit des Xyle-Datensatzes sind zwei pKb-Werte notwendig (*Gleichung G43*).

$$I_P(pH) = \frac{I_{\max}}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad \text{G40}$$

(für die Protonenfreisetzung)

$$I_P(pH) = \frac{I_{\max}}{1 + 10^{pH - pK_b}} \quad \text{G41}$$

(für die Protonenbindung)

$$I_P(pH) = \frac{I_{\max 1}}{1 + 10^{pH - pK_{b1}}} + \frac{I_{\max 2}}{1 + 10^{pH - pK_{b2}}} \quad \text{G42}$$

(für die Protonenbindung in wt Xyle)

$$I_P(pH) = \frac{I_{\max}}{1 + 10^{pH - pK_b}} + I_{\min} \quad \text{G43}$$

(für die Protonenbindung in wt GlcP)

### Bestimmung des pK-Wertes der Zuckerbindung mittels Modellgleichung

Zur Bestimmung des pK-Wertes der Zuckerbindung an Xyle auf Basis der pH-Abhängigkeit der KM-Werte, wird sowohl für die Zuckerbindung als auch für die Protonenbindung ein schnelles Gleichgewicht angenommen (*Gleichung G44*). Zudem wird vorausgesetzt, dass der Transporter protoniert sein muss, bevor der Zucker bindet. Als Fit-Gleichung ergibt sich so *Gleichung G45*, wobei

der experimentell bestimmte, pH-abhängige KM-Wert mit  $\tilde{K}_S(\text{pH})$  gleichgesetzt wird. [Gleichung G45](#) zeigt, dass durch das vorgelagerte Gleichgewicht die Halbsättigungskonzentration der nachfolgenden Zuckerbindung beeinflusst wird. Zeigt der pH-Wert eine große Abweichung vom pK-Wert, steigt die Halbsättigungskonzentration der Zuckerbindung weit über den  $K_S$ -Wert hinaus an. Dies hat gleichermaßen Einfluss auf die experimentell bestimmten  $K_D$ - und  $K_M$ -Werte (siehe [oben](#)).



$$\text{mit } K_H = \frac{c_P \cdot c_H}{c_{PH}} \quad \text{und} \quad K_S = \frac{c_{PH} \cdot c_S}{c_{PSH}}$$

$$\frac{c_{PHS}}{c_{P0}} = \frac{c_H \cdot c_S}{c_H \cdot K_S + K_H \cdot K_S + c_H \cdot c_S} = \frac{c_S}{c_S + K_S \left(1 + \frac{K_H}{c_H}\right)}$$

$$\text{mit } \tilde{K}_S(\text{H}) = K_S \left(1 + \frac{K_H}{c_H}\right)$$

$$\text{mit } -\text{pH} = \log c_H \quad \text{und} \quad -\text{pK} = \log K_H$$

$$\rightarrow \tilde{K}_S(\text{pH}) = K_S(1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}}) \quad \text{G45}$$

### Anpassung der NA-Zeit-Abhängigkeit der Peakströme

Für den Fit der NA-Zeit-Abhängigkeit des inneren pH-Wertes im SSM-Experiment ([Seite 111](#), [Abbildung 38](#)) wurden analog zu [Gleichungen G51](#) und [G52 \(Seite 67\)](#) die [Gleichungen G46](#) und [G47](#) mit  $\Delta\text{pH}_2 = 3,6 - \Delta\text{pH}_1$  verwendet.

$$\text{pH} = \Delta\text{pH}_1 \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_1}}\right) + (3,6 - \Delta\text{pH}_1) \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_2}}\right) + 4,9 \quad \text{G46}$$

(für pH-Sprung von pH 4,9 auf pH 8,5)

$$\text{pH} = \Delta\text{pH}_1 \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_1}}\right) + (3,6 - \Delta\text{pH}_1) \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_2}}\right) + 2,9 \quad \text{G47}$$

(für pH-Sprung von pH 2,9 auf pH 6,5)

### Rekonstruktion der Transporterströme

Unter Berücksichtigung der elektrischen Parameter der Verbundmembran aus SSM und PM kann der Transporterstrom aus dem detektierten kapazitiv gekoppelten Strom durch numerische Prozessierung auf Basis der Schaltkreisanalyse mit MathCAD 15 rekonstruiert werden [[210](#), [215](#), [216](#)]. Hierfür wird ein Algorithmus von Läger verwendet, der so modifiziert wurde, dass die Potentialabhängigkeit des Transports berücksichtigt ist ([Gleichung G48](#)).

$$I_P(t) = \left(1 - \frac{C_P}{C_{SSM}}\right) \cdot \left(I(t) + \frac{1}{\tau_0} \int_0^t I(t) dt\right) \quad \text{G48}$$

$I_P(t)$ : Transporterstrom;  $C_P$ : Kapazität der PM;  $C_{SSM}$ : Kapazität der SSM;  $I(t)$ : detektierter kapazitiv gekoppelter Strom;  
 $\tau_0$ : Systemzeitkonstante

Kurz zusammengefasst wird der Transporterstrom in einen Potential-unabhängigen transienten Strom und einen Potential-abhängigen *steady-state* Strom zerlegt. Infolge der Rekonstruktion bleiben daher *pre steady-state* Ladungsverschiebungen unverändert, während der stationäre Transporterstrom aus dem Potential-abhängigen Teil der Gleichung abgeleitet wird.

## Kinetische Modelle und Simulationen

Kinetische Simulationen *in silico* eignen sich hervorragend zur Überprüfung kinetischer Modelle. Für ein detaillierteres Verständnis des Transportmechanismus ist es von Bedeutung ein kinetisches Modell zu entwickeln, das die experimentellen Daten hinreichend beschreibt. In MathCAD 15 wurden die Transporterströme auf Basis eines kinetischen Modells simuliert und die Ergebnisse mit den experimentellen Daten verglichen.

Je nach Fragestellung wird versucht die experimentellen Daten mit verschiedenen Modellen zu erklären, die sich in ihrer Komplexität unterscheiden. Das 8-Zustands-Modell lässt sich als vollständiges Modell verstehen, das alle Transportmodi (Uniport, Austausch, Symport, Antiport) berücksichtigt. Das 6-Zustands-Modell oder MKM eignet sich zur Beschreibung des PMF-gekoppelten Symports und wird für die meisten Simulationen verwendet. Das 4-Zustands-Modell berücksichtigt lediglich Protonenbindung und -freisetzung sowie die Konformationsänderungen im protonierten und unprotonierten Carrier.

### Das 8-Zustands-Modell

Das 8-Zustands-Modell wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingeführt, um insbesondere für GlcP gleichermaßen Uniport, Symport und Antiport erklären zu können. Eine ausführliche Betrachtung des Modells findet sich in der Diskussion ([Seite 150, Abbildung 54](#)). Meist wurde das 6-Zustands-Modell als Vereinfachung des 8-Zustands-Modells betrachtet (siehe [unten](#)). In kinetischen Simulationen auf Basis des 8-Zustands-Modells wurden die Ratenkonstanten der vier Konformationsänderungen symmetrisch festgelegt und so variiert, dass die experimentellen Ergebnisse für GlcP reproduziert werden können. Die Bindungsreaktionen wurden als schnelle Gleichgewichte mit symmetrischen KD- und pK-Werten festgesetzt. Die Potential-abhängige Reaktionen sind die Konformationsänderungen in PS und P.

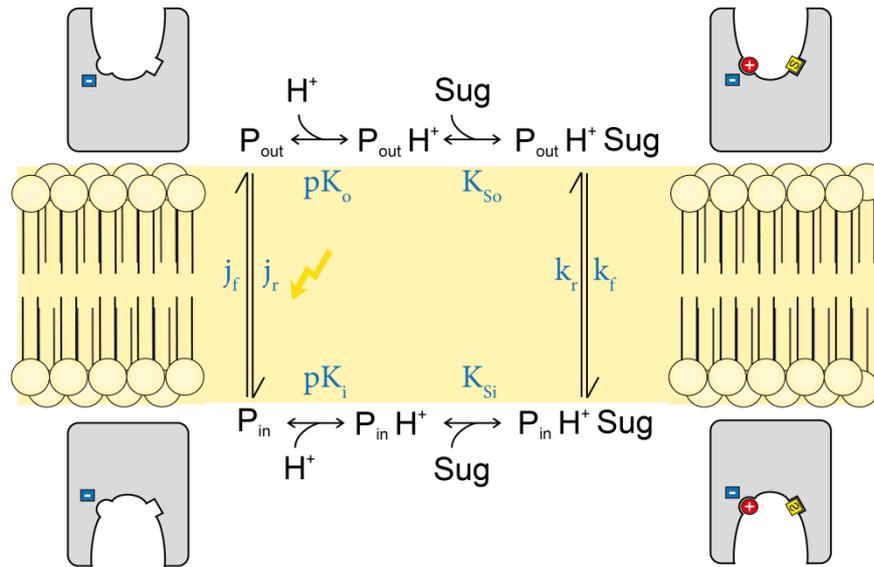
## Das 6-Zustands-Modell (MKM)

Es wurden Simulationen auf Basis eines minimalen kinetischen 6-Zustands-Modells durchgeführt ([Abbildung 18](#)), das dem minimalen kinetischen Modell nach Garcia-Celma et al. ähnelt [[163](#)]. Dabei wird ein doppeltes Gleichgewicht für den Transporter im einwärtsgerichteten (Index *in*) und auswärtsgerichteten (Index *out*) Zustand angenommen. Jeweils der leere und der vollständig beladene Carrier können zwischen einwärts- und auswärtsgerichteter Konformation wechseln.

Im Gegensatz zu Modellen, welche die Realität besser widerspiegeln, wurden folgende Vereinfachungen eingeführt, um die Anzahl freier Parameter zu reduzieren:

- (1) Konformationsänderungen, die in möglichen Uniport oder Antiport-Zyklen beobachtet werden, sind vernachlässigt ([Seite 150, Abbildung 54](#)).
- (2) Das Öffnen und Schließen der Kavitäten und die Konformationsänderung im Zuge des *Alternating Access* werden zu einer Reaktion zusammengefasst ([Seite 76, Abbildung 24](#)).
- (3) Die  $pK_o$  und  $pK_i$ -Werte sind topologisch mit der peri- bzw. zytoplasmatischen Seite des Transporters verbunden und werden nicht als Aufnahme- und Abgabe- $pK$ -Werte betrachtet ([Seite 184, Abbildung 60](#)).
- (4) Die Zucker- und Protonenbindung sowie -freisetzung werden als geordnet angenommen. Es findet keine Zuckerbindung an den unprotonierten Carrier statt ([Seite 150, Abbildung 54](#)).
- (5) Alle Bindungsreaktionen werden als schnelle Gleichgewichte betrachtet. Protonenbindung und Protonenfreisetzung können für keinen pH-Wert selbst ratenlimitierend werden ([Seite 177, Abbildung 59](#)).
- (6) Als einzige elektrogene Reaktion wird die Konformationsänderung des leeren Carriers angenommen, sodass nur diese Potential-abhängig ist. Die Elektrogenität der *pre steady-state* Reaktion ist vernachlässigt ([Seite 165, Abbildung 55](#)).

Die Bindungsreaktionen werden als schnelle Gleichgewichtsreaktionen mit den Gleichgewichtskonstanten  $pK$  und  $K_S$  angenommen. Dabei wird die Zuckerbindung mit identischen  $K_S$ -Werten, die Protonenbindung mit unterschiedlichen  $pK$ -Werten im auswärts- und einwärtsgerichteten Transporter festgelegt. Für die Konformationsänderungen des leeren und beladenen Carriers werden die Ratenkonstanten  $j$  bzw.  $k$  definiert, jeweils mit einer Vorwärts- (Index *f*) und einer Rückwärtsrate (Index *r*). Für die Raten der Konformationsänderungen gibt es experimentelle Evidenzen, wie in der Einleitung auf [Seite 25f](#) beschrieben. Die Ratenkonstante der Vorwärtsreaktion des beladenen Carriers wird daher auf  $250 \text{ s}^{-1}$ , die der Vorwärtsreaktion des leeren Carriers auf  $50 \text{ s}^{-1}$  festgelegt. Diese Ratenkonstanten wurden für LacY bestimmt und können durchaus in den übrigen Transportern abweichen. Die Simulationen dienen nur als grobe Näherung.



**Abbildung 18: Minimales kinetisches Modell zur Simulation der in SSM-Experimenten erhaltenen Parameter.** Im Gegensatz zu Modellen, welche Teilreaktionen des Zyklus besser beschreiben würden, wurden hier verschiedene Vereinfachungen umgesetzt. Alle Zucker-induzierten Konformationsänderungen (*induced fit* und *Alternating Access*) sowie Konformationsänderungen des leeren Carriers wurden jeweils zu einer Reaktion mit den Ratenkonstanten  $kr/f$  bzw.  $jr/f$  zusammengefasst. Zudem wurden alle weiteren möglichen Konformationsänderungen wie die des neutralisierten Carriers ohne gebundenes Zuckermolekül (PH) vernachlässigt. Protonenbindung/-freisetzung und Zuckerbindung/-freisetzung sind durch die Gleichgewichtskonstanten  $pK_o/pK_i$  bzw.  $K_{So}/K_{Si}$  beschrieben und die Reihenfolge von Bindung und Freisetzung der beiden Substrate ist festgelegt. Als elektrogene und damit Potential-abhängige Reaktion wird die Konformationsänderung des leeren Carriers betrachtet (gelber Pfeil), während die Elektrogenität des *pre steady-state* Signals vernachlässigt ist.

Zunächst wurden für LacY drei Simulationen durchgeführt, bei denen die *Detailed Balance* Bedingung unterschiedlich berücksichtigt wurde ([Seite 136](#), [Tabelle 25](#)). Die *Detailed Balance* Bedingung führt aufgrund asymmetrischer  $pK$ -Werte zusätzliche asymmetrische Reaktionen in den Transportzyklus ein. Im ersten und zweiten Fall, wird die Ratenkonstante der Rückwärtsreaktion des beladenen Carriers (BC) bzw. die des leeren Carriers (LC) mittels *Detailed Balance* Faktor  $R$  erhöht. Die Ratenkonstanten der jeweils anderen Konformationsänderung sind symmetrisch, d.h. die Ratenkonstanten für Vorwärts- und Rückwärtsreaktion sind identisch. Im dritten Fall wird die Erhöhung der Ratenkonstanten für die Rückwärtsreaktion auf beide Konformationsänderungen (BLC) verteilt. Die entsprechenden Gleichungen sind [Tabelle 9](#) zu entnehmen. Die übrigen Parameter für diese Simulationen sind in [Tabelle 10](#) gelistet.

**Tabelle 9: Berücksichtigung der *Detailed Balance* Bedingung in drei verschiedenen Szenarien.** Es werden jeweils die Rückwärtsrate des beladenen Carriers (BC), des leeren Carriers (LC) bzw. des beladenen und des leeren Carriers (BLC) durch Multiplikation mit dem *Detailed Balance* Faktor R erhöht.

Beladener Carrier (BC)	Leerer Carrier (LC)	BC und LC (BLC)
$k_r = k_f \cdot R$ $j_r = j_f$ $R = \frac{j_f \cdot 10^{-pK_i} \cdot K_{Si}}{j_r \cdot 10^{-pK_o} \cdot K_{So}}$	$j_r = j_f \cdot R$ $k_r = k_f$ $R = \frac{k_f \cdot 10^{-pK_i} \cdot K_{Si}}{k_r \cdot 10^{-pK_o} \cdot K_{So}}$	$j_r = j_f \cdot \sqrt{R}$ $k_r = k_f \cdot \sqrt{R}$ $R = \frac{10^{-pK_i} \cdot K_{Si}}{10^{-pK_o} \cdot K_{So}}$

**Tabelle 10: Parameter für die kinetische Simulation im 6-Zustands-Modell (MKM).**

$K_{So} = K_{Si}$	Gleichgewichtskonstante der Zuckerbindung innen/außen
$pK_o, pK_i$	pK-Werte für die Protonenbindung innen/außen
$pH_o, pH_i$	pH-Werte innen/außen
$c_{So}, c_{Si}$	Zuckerkonzentrationen innen/außen
$k_f = 250 \text{ s}^{-1}$	Vorwärtsratenkonstante des beladenen Carriers
$k_r = k_f \cdot R$	Rückwärtsratenkonstante des beladenen Carriers
$R = \frac{j_f \cdot 10^{-pK_i} \cdot K_{Si}}{j_r \cdot 10^{-pK_o} \cdot K_{So}}$	<i>Detailed Balance</i> Faktor
$j_{f0} = j_{r0} = 50 \text{ s}^{-1}$	Ratenkonstanten des leeren Carriers für $U_m = 0 \text{ V}$
$j_f = j_{f0} \cdot e^{-U_m/2V}$	Vorwärtsratenkonstante des leeren Carriers
$j_r = j_{r0} \cdot e^{U_m/2V}$	Rückwärtsratenkonstante des leeren Carriers
$U_m = -0.1 \text{ V}$	Membranpotential
$V = RT/F = 25,26 \text{ mV}$	

In den vergleichenden kinetischen Simulationen für LacY, FucP und XylE, wurde in allen Fällen das BC-Szenarium gewählt, sodass die Ratenkonstanten für die Konformationsänderung des beladenen Carriers als asymmetrisch angenommen werden (*Seite 139, Tabelle 26*). Durch die Potential-Abhängigkeit der Konformationsänderung des leeren Carriers ergeben sich bei anliegendem Membranpotential zusätzlich asymmetrische effektive Raten für j. In *Tabelle 10* sind alle Parameter

für die durchgeführten Simulationen im MKM zusammengefasst. Die Umsatzrate ist abhängig von verschiedenen Parametern (Herleitung auf [Seite A20](#)) und lässt sich mit [Gleichung G49](#) beschreiben.

$$U(pK_o, pK_i, K_{So}, K_{Si}, k_f, k_r, j_f, j_r, pH_o, pH_i, c_{so}, c_{si}, U_m) = c_{phso} \cdot k_f - c_{phsi} \cdot k_r \quad \mathbf{G49}$$

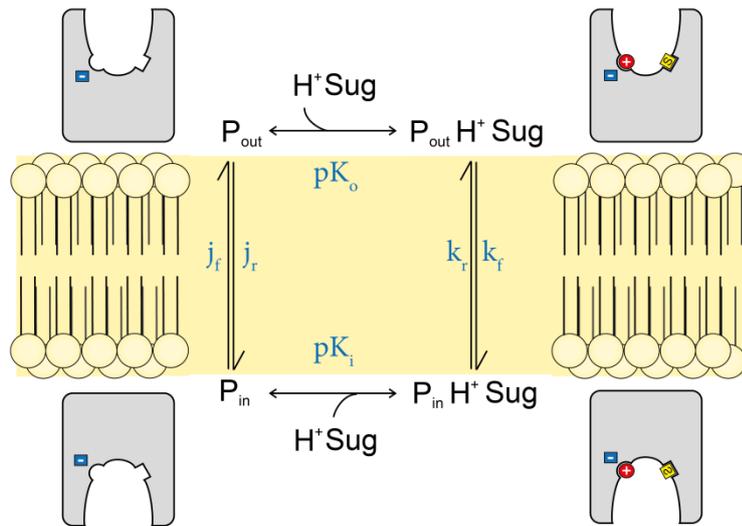
Als Variablen, welche die äußeren Bedingungen im Experiment beschreiben, fungieren die pH-Werte ( $pH_o = pH_i$ ) sowie Zuckerkonzentrationen ( $c_{so}$ ,  $c_{si}$ ) auf beiden Seiten der Membran sowie das Membranpotential  $U_m$ . Da im SSM-Experiment zum Zeitpunkt des Peakstroms kein Potential anliegt, wird für die Simulationen der Umsatzraten unter experimentellen Bedingungen das Membranpotential null gesetzt. Damit die Abhängigkeit der Umsatzrate von den äußeren Bedingungen (pH-Werte, Zuckerkonzentrationen) simuliert werden kann, müssen die frei einstellbaren Parameter im MKM ( $K_{Si}$ ,  $K_{So}$ ,  $pK_i$ ,  $pK_o$ ) festgelegt werden. Als KS-Werte werden die experimentell ermittelten KD-Werte der Transporter verwendet ([Seite 87](#), [Tabelle 16](#)). Aus der pH-Abhängigkeit der Umsatzrate können als Halbsättigungswerte der Glockenkurve die apparenten  $pK_a$ - und  $pK_b$ -Werte abgelesen werden. Diese werden in der Simulation durch Variation der realen  $pK_i$ - und  $pK_o$ -Werte so eingestellt, dass sie den gemessenen apparenten  $pK_a$ - und  $pK_b$ -Werten entsprechen ([Seite 103](#), [Tabelle 19](#)). Dabei sind die Zuckerkonzentrationen so festgelegt, wie sie auch im Experiment verwendet wurden ( $c_{so} = 30$  mM für L-Fucose und D-Xylose,  $c_{so} = 100$  mM für Lactose;  $c_{si} = 0$  mM). Mit den so ermittelten realen  $pK$ -Werten können aus der Konzentrations-Abhängigkeit der Umsatzrate für einen definierten pH-Wert die Halbsättigungswerte bzw. KM-Werte abgelesen werden. Stimmen KM- und apparente  $pK$ -Werte der Simulation mit denen des Experiments überein, so eignet sich das 6-Zustands-Modell mit den entsprechenden Parametern zur Beschreibung des Transportmechanismus.

Mithilfe des minimalen kinetischen Modells kann darüber hinaus überprüft werden, ob die Transporter mit den aus der Simulation erhaltenen realen  $pK_i$ - und  $pK_o$ -Werten unter *in vivo* Bedingungen effiziente Umsatzraten erzielen. Dazu werden die Variablen ( $pH_i$ ,  $pH_o$ ,  $c_{si}$ ,  $c_{so}$ ,  $U_m$ ) so eingestellt, dass sie den Werten *in vivo* entsprechen. Die Werte  $pH_i = 7,6$  und  $U_m = -0,1$  V sind als *in vivo* hochregulierte Parameter in allen Simulationen festgelegt, während für die Zuckerkonzentrationen und den äußeren pH-Wert verschiedene Extremwerte getestet werden. Die Wahl der Parameter ist im Ergebnisteil auf [Seite 141f](#) ausführlich begründet. Die  $pK_i$ - und  $pK_o$ -Werte werden als unabhängige Variablen betrachtet, sodass die Abhängigkeit der Umsatzrate von den  $pK$ -Werten untersucht werden kann. Zudem wird betrachtet, wie sich die optimalen  $pK_i$ - und  $pK_o$ -Werte verschieben, wenn sich  $pH_o$ ,  $c_{si}$  und  $c_{so}$  ändern. Die aus der Simulation erhaltenen  $pK_i$ - und  $pK_o$ -Werte der drei *E.coli* Transporter können mit den unter verschiedenen äußeren

Bedingungen optimalen pKi- und pKo-Werten verglichen werden. So wird überprüft, ob die ermittelten pKi- und pKo-Werte tatsächlich den optimalen pKi- und pKo-Werten entsprechen.

### Das 4-Zustands-Modell

Im 4-Zustands-Modell werden die Protonierungs- und Deprotonierungs-Reaktionen als vorgelagerte Gleichgewichtsreaktionen für die jeweils folgenden Konformationsänderungen betrachtet (*Abbildung 19*). Dabei werden Zuckerbindung und Zuckerfreisetzung vernachlässigt.



**Abbildung 19: Das 4-Zustands-Modell zur Simulation der pH-Abhängigkeit.** Das Modell berücksichtigt ausschließlich Protonierung und Deprotonierung als schnelle vorgelagerte Gleichgewichte für die Konformationsänderungen. Die *Detailed Balance* Bedingung ist nicht berücksichtigt.

Die Umsatzrate  $U(pH)$  kann analytisch berechnet werden (*Gleichung G50*), wenn die effektiven Raten für die Konformationsänderung des beladenen Carriers ( $v_{BC}$ ) und des leeren Carriers ( $v_{LC}$ ) bekannt sind. Diese werden von den Ratenkonstanten  $k_f$  bzw.  $j_f$  sowie den Edukt-Konzentrationen  $c_{PH}$  bzw.  $c_P$  bestimmt. Sie sind demnach nur abhängig von den jeweiligen  $pK_o$ - und  $pK_i$ -Werten sowie dem  $pH$ -Wert. Es ist anzumerken, dass es sich nicht um eine analytische Lösung für den Gleichgewichtszustand handelt, da die *Detailed Balance* Bedingung nicht berücksichtigt ist.

$$c_{PH} = \frac{10^{-pH}}{10^{-pH} + 10^{-pK_o}} \quad \text{und} \quad c_P = \frac{10^{-pK_i}}{10^{-pH} + 10^{-pK_i}}$$

$$v_{BC} = k_f \cdot c_{PH} \quad \text{und} \quad v_{LC} = j_f \cdot c_P$$

$$\text{mit } k_f = 250s^{-1} \quad \text{und} \quad j_f = 50s^{-1}$$

$$U(pH) = (v_{BC}^{-1} + v_{LC}^{-1})^{-1}$$

**G50**

## Fluoreszenzmessungen

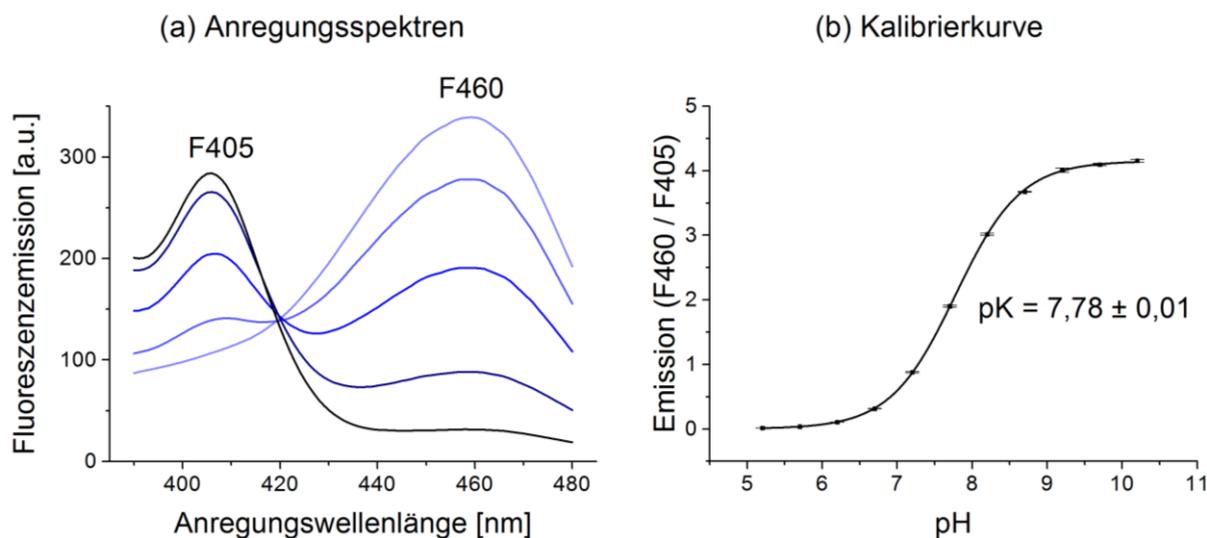
Der pH-sensitive Farbstoff Pyranin wurde verwendet, um die Zeitabhängigkeit des intraliposomalen pH-Werts infolge einer pH-Titration am Fluorometer (Hitachi F4500 Fluoreszenzspektrometer) zu bestimmen. Der Potential-sensitive Farbstoff DISC3(5) wurde verwendet um das sich infolge derselben pH-Titration aufbauende Membranpotential zu messen. So werden wichtige Informationen über die Stabilität von pH-Gradienten an vesikulären Lipidmembranen erhalten.

### Messungen mit Pyranin

Pyranin ist ein pH-sensitiver Farbstoff, der sich nicht in Membranen einlagert. Durch Protonierung verschiebt sich die Anregungswellenlänge der Fluoreszenz bei 520 nm von 460 nm auf 405 nm mit einem isospeptischen Punkt bei 420 nm [220, 221].

### Kalibrierung

Um quantitative Aussagen bezüglich der pH-Änderung zu ermöglichen, werden Anregungsspektren bei verschiedenen pH-Werten aufgenommen (Abbildung 20a). Die Peaks bei 460 nm (F460) und 405 nm (F405) werden für die Kalibrierkurve verwendet (Abbildung 20b).



**Abbildung 20: Pyranin-Anregungsspektren für verschiedene pH-Werte und daraus abgeleitete Kalibrierkurve.** (a) Anregungsspektren für verschiedene pH-Werte. Die Emission wird bei einer festen Wellenlänge von 520 nm detektiert. Weitere Einstellungen sind [Tabelle 11](#) zu entnehmen. (b) Aus den Fluoreszenzwerten F460 und F405 der Anregungsspektren abgeleitete Kalibrierkurve. Für den Fit wurde die Titrationsgleichung  $F_{460}/F_{405} = A/(1 + 10^{pK_a - pH})$  verwendet.

Die Messpuffer enthalten 25  $\mu$ M Pyranin und 100 mM KPi, eingestellt auf pH-Werte zwischen 5,2 und 10,2. Für jeden pH-Wert werden drei Messungen durchgeführt. Jeweils 1 ml wird in eine Quarzküvette überführt und die Anregungsspektren aufgenommen. Die Einstellungen am Fluorometer sind in [Tabelle 11](#) aufgeführt.

**Tabelle 11: Fluorometer-Einstellungen zur Aufnahme von Pyranin-Anregungsspektren.**

Emissionswellenlänge	520 nm
Anregungswellenlänge	380-490 nm
Scan-Geschwindigkeit	2400 nm/min
Spaltbreite Anregungsmonochromator	2,5 nm
Spaltbreite Detektionsmonochromator	5 nm
Spannung am Photomultiplier	700 V
Spectral Response	0,5 s

### ***Probenvorbereitung reiner Lipid-Vesikel***

In Chloroform gelöstes Lipid (Avanti Polar Lipids Inc.) wird am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel getrennt und anschließend mit Messpuffer (100 mM KPi, 200  $\mu$ M Pyranin bei pH 6,7 bzw. pH 8,7) zu einer finalen Lipidkonzentration von 10 mg/ml versetzt. Durch 2 min Sonifizieren im Ultraschallwasserbad (Sonorex RK 52 H, Bandelin), 15 min schnellem Schütteln (IKA Vibrax VXR basic, 1.000 rpm) und erneutem Sonifizieren werden die Lipide gelöst. Es folgt die Herstellung unilamellarer Vesikel durch Extrusion mittels Liposofast (Avestin Inc., 20 Zyklen, 400 nm Filter-Porengröße) und die Überprüfung der Proben-Homogenität mittels dynamischer Lichtstreuung am ZetaPlus Zeta Potential Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation). Der effektive Durchmesser der präformierten Liposomen liegt zwischen 100 und 200 nm.

### ***Probenvorbereitung Proteoliposomen***

Für die fluorometrischen Messungen wurden Proteoliposomen mit wt Xyle zu verschiedenen LPRs hergestellt, wie auf [Seite 43f](#) beschrieben. Nach der Rekonstitution wird ein Aliquot (etwa 5 mg/ml Lipid) mit 200  $\mu$ M Pyranin versetzt, auf den entsprechenden pH-Wert (6,7 bzw. 8,7) titriert und im Ultraschallwasserbad für 10 s sonifiziert, um die Proteoliposomen mit Pyranin zu beladen und den inneren pH-Wert anzugleichen. Nach Sonifizieren wird der pH-Wert nochmals überprüft und gegebenenfalls gegentitriert. Die Probe wird anschließend in 10 Zyklen zu je 10 s sonifiziert.

### ***Entfernen von Pyranin im äußeren Medium***

Damit Pyranin nur den intraliposomalen pH-Wert detektiert, müssen Moleküle außerhalb der Liposomen entfernt werden. Nach Beladen der Proben erfolgt daher ein Pufferaustausch mit einer Sephadex PD10 Säule (GE Healthcare Life Sciences). Die Säule wird mit 15 ml Puffer (100 mM KPi, pH 6,7 bzw. 8,7) äquilibriert. Anschließend werden 2,5 ml Probe auf die Säule geladen und mit 3,5 ml Puffer eluiert. Das Eluat wird im Falle der Liposomen nochmals mit Puffer 1:1 auf eine finale Lipidkonzentration von 3,6 mg/ml verdünnt. Im Falle der Proteoliposomen entspricht die Lipidkonzentration direkt nach Elution etwa 3,6 mg/ml.

### **Ablauf der Messreihen**

Jeweils 1 ml der Probe wird in eine Quarz-Küvette überführt. Die pH-Titration erfolgt durch Zugabe von 20,1 µl 23 %iger Phosphorsäure (pH 8,7 auf 5,7) bzw. 11,5 µl 10 M KOH (pH 6,7 auf 9,7) unter schnellem Rühren innerhalb des Spektrometers. Die Totzeit für das Öffnen und Schließen der Messkammer liegt bei etwa 2 s.

Je Probe werden mindestens fünf pH-Titrations durchgeführt. Vor Titration und bei definierten Zeitpunkten (2 s - 30 min) nach Titration wird ein Anregungsspektrum aufgenommen, um F460/F405 zu erhalten. Die entsprechenden Fluorometer-Einstellungen sind in [Tabelle 11](#) zusammengefasst. Die F460/F405 Werte von mindestens drei Messreihen werden gemittelt und mit der Kalibrierkurve ([Abbildung 20](#)) in die intraliposomale pH-Änderung umgerechnet. Zuletzt erfolgen die Zugabe von 50 µM Nigericin und die erneute Messung eines Anregungsspektrums nach 1 min. Dadurch wird der restliche pH-Gradient sofort abgebaut. Der innere pH-Wert sollte dem äußeren pH-Wert entsprechen.

Als zusätzliches Experiment wird der Einfluss von Valinomycin auf die Änderung des inneren pH-Wertes untersucht. Valinomycin erhöht die Kalium-Permeabilität der Membran und könnte so indirekten Einfluss auf die Stabilität des pH-Gradienten nehmen. In mindestens einer Messreihe für jede Lipid-Probe wurden vor pH-Titration 5 µM Valinomycin hinzugegeben und 10 min unter Rühren inkubiert. Es folgten pH-Titration, Messung von F460/F405 und Zugabe von Nigericin wie oben beschrieben.

### **Anpassung der Zeit-abhängigen pH-Änderung mit biexponentieller Funktion**

Die Datenpunkte F460/F405 nach pH-Titration werden zunächst anhand der Kalibrierkurve ([Abbildung 20](#)) in pH-Werte umgerechnet. Diese werden dann gegen die Zeit geplottet und je nach pH-Titration mit der [Gleichung G51](#) oder [G52](#) gefittet. Die Gleichungen repräsentieren den biphasischen Verlauf des intraliposomalen pH-Wertes nach pH-Titration ([Seite 92, Abbildung 30](#)). Dabei sind ΔpH<sub>1</sub> und ΔpH<sub>2</sub> die Amplituden der ersten schnellen Phase bzw. der zweiten langsamen Phase der pH-Änderung und τ<sub>1</sub> bzw. τ<sub>2</sub> ihre Zeitkonstanten. Da die pH-Titration immer mit ΔpH = 3 erfolgt, wird für den Fit ΔpH<sub>2</sub> = 3 - ΔpH<sub>1</sub> festgesetzt.

$$\text{pH} = \Delta\text{pH}_1 \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_1}}\right) + (3 - \Delta\text{pH}_1) \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_2}}\right) + 6,7 \quad \text{G51}$$

(für pH-Titration von pH 6,7 auf pH 9,7)

$$\text{pH} = -\Delta\text{pH}_1 \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_1}}\right) - (3 - \Delta\text{pH}_1) \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_2}}\right) + 8,7 \quad \text{G52}$$

(für pH-Titration von pH 8,7 auf pH 5,7)

### **Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten für Protonen**

Der Abbau des pH-Gradienten verläuft biphasisch (*Seite 92, Abbildung 30*). Aus der Anfangssteigung der ersten schnellen Phase kann der Permeabilitätskoeffizient für Protonen berechnet werden. Diese lässt sich durch Differentiation bestimmen (*Gleichung G53*).

$$\frac{\Delta\text{pH}(t)}{dt} = \frac{\Delta\text{pH}_1}{\tau_1} \cdot e^{-\frac{t}{\tau_1}} + \frac{\Delta\text{pH}_2}{\tau_2} \cdot e^{-\frac{t}{\tau_2}}, \quad \frac{\Delta\text{pH}(0)}{dt} = \frac{\Delta\text{pH}_1}{\tau_1} + \frac{\Delta\text{pH}_2}{\tau_2} \quad \text{G53}$$

$$\text{mit } \frac{\Delta\text{pH}_1}{\tau_1} \gg \frac{\Delta\text{pH}_2}{\tau_2} \text{ folgt: } \frac{\Delta\text{pH}(0)}{dt} = \frac{\Delta\text{pH}_1}{\tau_1}$$

Die Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten erfolgt über den Fluss (*Gleichung G54*) [222]. Die Änderung der intraliposomalen Protonen-Konzentration ( $dc/dt$ ) lässt sich aus der intraliposomalen pH-Änderung ( $dpH/dt$ ) berechnen, wenn die Pufferkapazität ( $dc/dpH$ ) bekannt ist (*Gleichung G55*). Sie bestimmt die Menge der über die Membran diffundierenden Protonen, die zu der entsprechenden pH-Änderung beiträgt.

$$P\Delta c = J_{\text{H}^+} = \frac{dc_{\text{H}^+}(t)}{dt} \cdot \frac{V}{A} = \frac{1}{3} r \cdot \frac{dc_{\text{H}^+}(t)}{dt} \quad \text{G54}$$

$$\frac{dc_{\text{H}^+}(t)}{dt} = \frac{dc}{dpH} \cdot \frac{dpH}{dt} \quad \text{G55}$$

*J*: Fluss; *P*: Permeabilitätskoeffizient; *r* = 50 nm: Radius der Liposomen; *V*: Volumen der Liposomen;  
*A*: Oberfläche der Liposomen;  $\Delta c$ : Protonen-Konzentrationsdifferenz auf beiden Seiten der Membran.

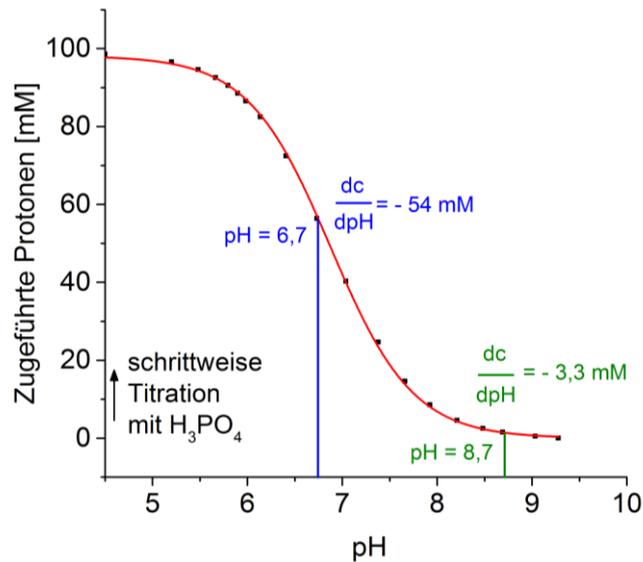
Die Pufferkapazität  $dc/dpH$  ergibt sich, wenn eine Puffer-Lösung (100 mM KPi, pH 9,2) schrittweise mit  $\text{H}_3\text{PO}_4$  titriert und die Menge zugeführter Protonen gegen den pH-Wert aufgetragen wird (*Abbildung 21*). Dann lässt sich der Permeabilitätskoeffizient für Protonen mit *Gleichung G56* berechnen.

$$P_{\text{H}^+} = \frac{r}{3\Delta c} \cdot \frac{dc(pH)}{dpH} \cdot \frac{\Delta\text{pH}_1}{\tau_1} \quad \text{G56}$$

### **Messungen mit DISC3(5)**

DISC3(5) (3,3'-Dipropylthiadicarbocyanin-Iodid) ist ein Potential-sensitiver Farbstoff, der sich in die Membran einlagert. Dabei unterscheiden sich die Fluoreszenzeigenschaften innerhalb der Membran (Emissionsmaximum bei 670 nm) und in wässrigem Medium (Emissionsmaximum bei 690 nm). Die Fluoreszenzemission ist für definierte Verhältnisse zwischen Lipid- und Fluorophor-Konzentration stark abhängig vom Potential [223]. Durch ein negatives Potential akkumuliert die membranständige

DISC3(5)-Population innerhalb der inneren Membranhälfte, sodass die erhöhte lokale Konzentration zum Selbstquenchen führt. Der Emissionspeak bei 670 nm sinkt dadurch mit negativem Potential.



**Abbildung 21: pH-Abhängigkeit der Konzentration zugeführter Protonen nach pH-Titration mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.** Für den Fit wurde die Titrationsgleichung  $c = A/(1 + 10^{pH-pK})$  verwendet. Der pK-Wert von 6,87 entspricht dem von KPi. Die für die Messungen relevanten Anfangssteigungen ergeben sich durch Differentiation zu:  $dc/dpH(pH = 6,7) = -54,27 \text{ mM}$  und  $dc/dpH(pH = 8,7) = -3,32 \text{ mM}$ .

### Kalibrierung

Zur Berechnung von Membranpotentialen auf Basis der DISC3(5)-Fluoreszenz wird eine Kalibrierkurve verwendet ([Abbildung 22](#)). Dazu werden Puffer mit verschiedenen Konzentrationsverhältnissen von TrisPi/KPi hergestellt (Gesamt-Osmolarität 100 mM, KPi-Konzentration von 0,1 mM bis 100 mM). Es werden 1 ml des jeweiligen Puffer-Gemischs in eine Quarz-Küvette überführt und 2,5 µl DISC3(5) (1 mM in Ethanol) hinzugegeben. Nach 15 min Inkubation unter Rühren, werden insgesamt 10 µl präformierte Liposomen (10 mg/ml Lipid, 100 mM KPi bei pH 7,6; Herstellung siehe [Seite 43f](#)) bzw. 20 µl Proteoliposomen (verschiedene LPR, 100 mM KPi bei pH 7,6) hinzugefügt, sodass sich ein nach außen gerichteter Kaliumgradient bildet, der abhängig von der Kaliumpermeabilität zum Aufbau eines Membranpotentials führt. Nach 2 min Inkubation wird die Fluoreszenz bei 660 nm (F) ermittelt, die direkt mit dem aufgebauten Membranpotential korreliert. Um die Kaliumpermeabilität zu erhöhen wird in Kontrollexperimenten hiernach 1 µM Valinomycin zugegeben (siehe [unten](#)).

Um die Fluoreszenz ohne anliegendes Membranpotential (FL) zu erhalten, wird der Kalium-Gradient durch Titration mit dem entsprechenden Konzentrationsverhältnis KPi/TrisPi (40 µl, Gesamt-Osmolarität 2,5 M; 99,5 % bis 0 % KPi und 0,5 % bis 100 % TrisPi) aufgehoben. Zur Kontrolle erfolgt zuletzt die Zugabe von 0,01 % DDM, um das Membranpotential direkt zu zerstören. Die Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften werden jeweils über die Aufnahme eines Emissionsspektrums nach

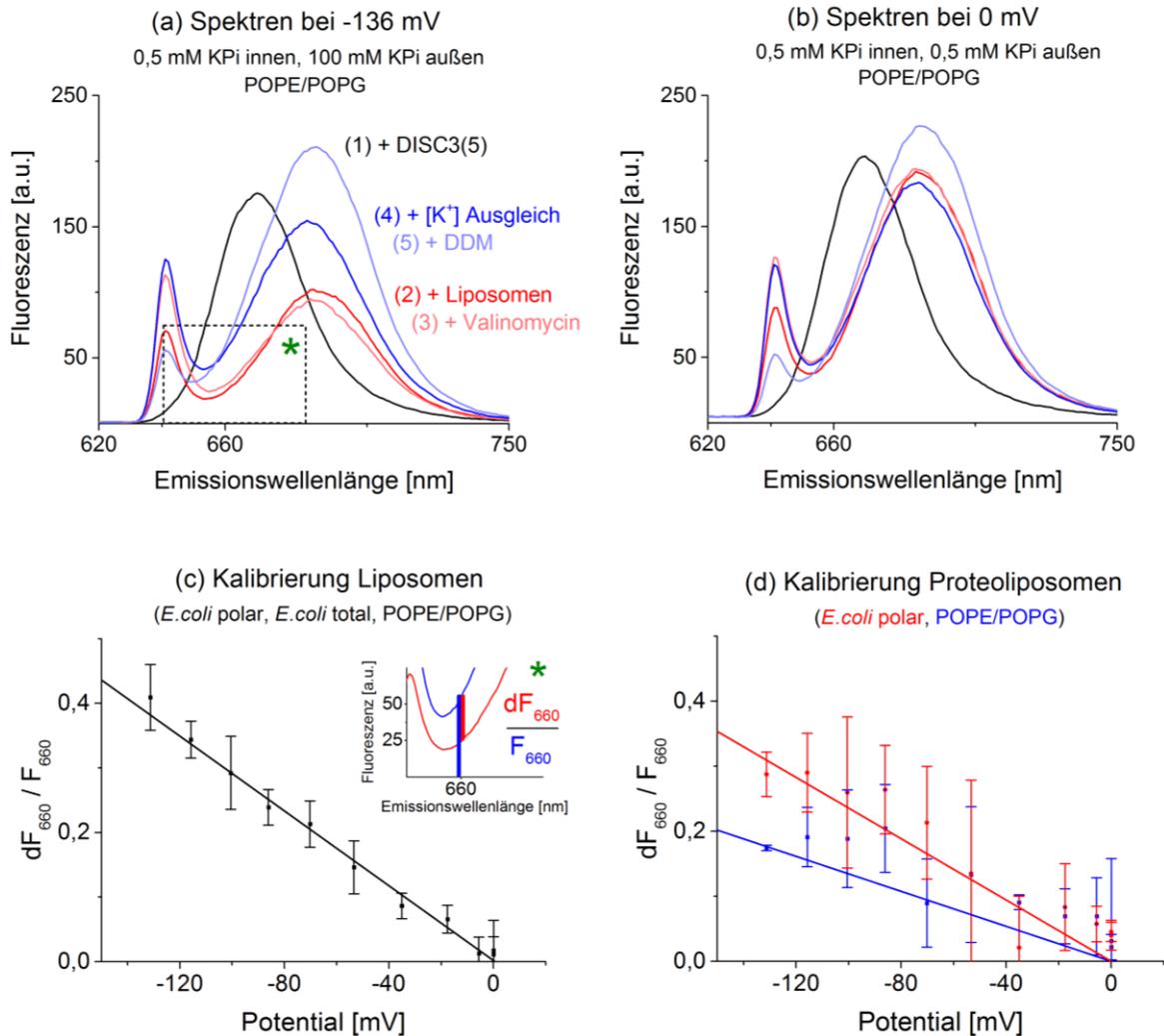
Zugabe von DISC3(5), Liposomen, Valinomycin, KPi und DDM bestimmt (*Abbildung 22a,b*). Die entsprechenden Fluorometer-Einstellungen sind in *Tabelle 12* gezeigt.

**Tabelle 12:** Fluorometer-Einstellungen zur Aufnahme von DISC3(5)-Emissionsspektren.

Emissionswellenlänge	600-750 nm
Anregungswellenlänge	635 nm
Cutoff-Filter vor Detektor	645 nm
Scan-Geschwindigkeit	2400 nm/min
Spaltbreite Anregungsmonochromator	5 nm
Spaltbreite Detektionsmonochromator	2,5 nm
Spannung am Photomultiplier	950 V
Spectral Response	0,5 s

Zur Berechnung der mit den entsprechenden Kaliumgradienten korrelierenden Membranpotentiale wird die Nernst-Gleichung verwendet (*Seite 8, Gleichung G9*). Dabei wurde berücksichtigt, dass die Liposomen-Zugabe dem äußeren Medium 0,5 mM KPi zuführt, sodass bei 100 mM TrisPi außen ein maximales Potential von -136 mV resultiert. Damit die Nernst-Gleichung anwendbar ist, also das Ergebnis eine Abweichung von < 1 % zum Resultat der Goldman-Gleichung (*Seite 8, Gleichung G10*) zeigt, muss die Kaliumpermeabilität mindestens um den Faktor  $10^{-6}$  größer sein als die Protonenpermeabilität (bei  $10^{-7,6}$  mM  $H^+$  und 100 mM  $K^+$ ). Zudem muss die Permeabilität für Kalium die Permeabilitäten für Phosphat und Tris um mindestens  $10^2$  übersteigen. Dass diese Annahmen gelten, zeigt die Valinomycin-Kontrolle. Eine Zugabe von 1  $\mu$ M Valinomycin führt zu keiner Fluoreszenzänderung (*Abbildung 22a,b*), sodass direkt nach Liposomen-Zugabe das Nernst-Potential aufgebaut ist. Zudem zeigt die erhaltene Eichkurve eine gute Übereinstimmung mit den in der Literatur gezeigten Datensätzen [224].

Für die Kalibrierkurve wird  $dF/FL = (FL-F)/FL$  gegen das für den entsprechenden Kaliumgradienten berechnete Nernst-Potential aufgetragen. Die Kalibrierkurve ist maßgeblich vom Lipid/DISC3(5) Konzentrationsverhältnis abhängig [223]. Es konnte aufgrund des Präparationsprotokolls für die reinen Lipid-Vesikel exakt eingestellt werden, weshalb die Kalibrierkurven für alle Lipid-Zusammensetzungen identisch waren (*Abbildung 22c*). Aufgrund der Rekonstitutionsmethode ist die genaue Lipidkonzentration in Proteoliposomen nicht bekannt (obere Grenze: 10 mg/ml). Weil das Konzentrationsverhältnis zwischen DISC3(5) und Lipid die Potential-Abhängigkeit stark beeinflusst (siehe *oben*), ergeben sich für die Proteoliposomen unterschiedliche Kalibrierkurven (*Abbildung 22d*). Aus diesem Grund wurden für jedes Präparat Proteoliposomen separate Kalibrierkurven angefertigt. Diese Kalibrierkurven werden dazu verwendet, um aus der DISC3(5)-Fluoreszenzänderung infolge einer pH-Titration auf das sich aufbauende Potential rückschließen zu können (siehe *unten*).



**Abbildung 22: Emissionsspektren für den maximalen und minimalen Kalium-Gradienten für Liposomen aus einem synthetischen POPE/POPG Gemisch und resultierende Kalibrierkurven.** (a) DISC3(5)-Emissionsspektren für den maximalen Kaliumgradienten mit 0,5 mM KPi innen und 100 mM KPi außen (-136 mV nach Nernst). Es sind jeweils die Spektren derselben Probe nach der Zugabe von DISC3(5) (schwarz), Liposomen (rot), Valinomycin (hellrot), KPi zur Aufhebung des Gradienten (blau) und DDM (hellblau) in der genannten und im Graphen durchnummerierten Reihenfolge dargestellt. Aus den Spektren werden bei 660 nm die Werte  $F$  und  $dF$  abgelesen. (b) DISC3(5)-Emissionsspektren ohne Kaliumgradienten mit 0,5 mM KPi innen und außen (0 mV nach Nernst). Es sind die entsprechenden Spektren in den Farben analog zur Abbildung (a) dargestellt. (c) Kalibrierkurve für reine Lipid-Vesikel. Sie entspricht der Mittelung aus den Zeit-abhängigen  $dF/F$ -Datensätzen von sechs Messreihen, jeweils zwei Messreihen für Liposomen mit *E.coli* polar Extrakt-Lipiden, *E.coli* total Extrakt-Lipiden und synthetischen POPE/POPG-Lipiden. Das Inset zeigt eine Vergrößerung des Kastens aus (a). Es ist dargestellt wie  $dF/F$  aus den Emissionsspektren zur Erstellung der Kalibrierkurve ermittelt wird. (d) Kalibrierkurven für Proteoliposomen (LPR 5) mit *E.coli* polar Extrakt-Lipiden (rot) bzw. POPE/POPG-Lipiden (blau). Für jede Kalibrierkurve wurden zwei Datensätze verwendet.

### Probenvorbereitung

Es wurden präformierte Liposomen verschiedener Lipidzusammensetzungen sowie rekonstituierte Proteoliposomen direkt für die Messungen verwendet. Die Herstellung ist auf [Seite 43f](#) beschrieben.

### Ablauf der Messreihen

Jeweils 1 ml Puffer (100 mM KPi, pH 6,7 bzw. pH 8,7) wird in eine Quarz-Küvette überführt und 2,5  $\mu$ l 1 mM DISC3(5) zugegeben (finale Konzentration: 2,5  $\mu$ M). Der zeitliche Verlauf der Emission bei 660 nm wird am Fluorometer aufgezeichnet (Einstellungen analog zu denen in [Tabelle 12](#)). Nach

15 Minuten Rühren werden 10 µl Liposomen (10 mg/ml, finale Konzentration: 0,1 mg/ml) oder 20 µl Proteoliposomen zugegeben, wobei sich die Fluoreszenz F einstellt. Nach 2 Minuten Inkubation erfolgt die pH-Titration durch Zugabe von 11,5 µl 10 M KOH (pH 6,7 auf 9,7) bzw. 20,1 µl 23 %iger Phosphorsäure (pH 8,7 auf 5,7). Die hierauf folgende Fluoreszenzänderung entspricht dF. Das so erhaltene dF/F kann mittels Kalibrierkurve in das entsprechende Potential umgerechnet werden, das sich infolge der pH-Titration aufgebaut hat. Zur Kontrolle erfolgt zuletzt die Zugabe von 0,01 % DDM, wonach das Potential zerstört wird und die Fluoreszenz wieder den Wert F erreicht.

### **Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten für Kalium**

Mit der Annahme, dass die Membran nur für Protonen und Kalium permeabel ist, lässt sich mithilfe der berechneten Permeabilität für Protonen ([Seite 68, Gleichung G56](#)) und dem mittels DISC3(5) bestimmten Potential infolge der pH-Titration ([Seite 95, Tabelle 17](#)) der Permeabilitätskoeffizient für die Gegenionendiffusion bestimmen ([Gleichung G57](#)).

$$\Delta\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{H^+} \cdot c_{H^+}^i + P_K \cdot c_K^i}{P_{H^+} \cdot c_{H^+}^o + P_K \cdot c_K^o} \rightarrow P_K = \frac{\left( e^{\frac{F\Delta\varphi}{RT}} (P_{H^+} \cdot c_{H^+}^o) - P_{H^+} \cdot c_{H^+}^i \right)}{\left( c_K^i - e^{\frac{F\Delta\varphi}{RT}} c_K^o \right)} \quad \mathbf{G57}$$

## Transportassays mit radioaktiv markierten Substraten

### **Messungen an wt GlcP**

Für die *Counterflow*- und *Exchange*-Messungen an wt GlcP wird gereinigtes Protein zu einer LPR 100 mit 10 mg/ml *E.coli* polar Extrakt-Lipiden in 100 mM KPi pH 7,5 rekonstituiert. Eine detaillierte Beschreibung der Rekonstitution ist auf [Seite 43f](#) gegeben. Zur Einstellung des pH-Wertes werden 100 µl Probe zu 1,5 ml KPi Puffer des entsprechenden pH-Wertes (5,5; 7,5; 9,5) gegeben und anschließend zentrifugiert (Beckman TL-100, TLA 100.2 Rotor, 60.000 rpm, 30 min). Die pelletierten Proteoliposomen werden in 100 µl KPi Puffer des entsprechenden pH-Wertes aufgenommen und 30 s im Wasserbad sonifiziert. Messpuffer und Proteoliposomen werden nun mit den Substraten beladen. Für die *Counterflow*-Messungen werden zu 50 µl Proteoliposomen des entsprechenden pH-Wertes 1 µl 1M D-Glucose (finale Konzentration: 20 mM) gegeben und 5 mal 30 s im Wasserbad sonifiziert. 1 ml des Messpuffers mit demselben pH-Wert werden mit 1,52 µl 3,3 mM <sup>14</sup>C markierte D-Glucose (finale Konzentration: 5 µM) versetzt. Für die *Exchange*-Messungen werden zu 50 µl Proteoliposomen des entsprechenden pH-Wertes 0,75 µl 3,3 mM <sup>14</sup>C markierte D-Glucose (finale Konzentration: 50 µM) gegeben und 5 mal 30 s im Wasserbad sonifiziert. 1 ml des Messpuffers mit demselben pH-Wert werden mit 5 µl 10 mM D-Glucose (finale Konzentration: 50 µM) versetzt.

Die Messungen werden durch Zugabe von 100 µl Messpuffer zu 2 µl beladenen Proteoliposomen desselben pH-Wertes gestartet. Nach Inkubation (3 s bis 30 min) wird die Reaktion durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Quench-Puffer (100 mM KPi, pH 5,5, 100 mM LiCl) gestoppt und über Vakuum mit einem 200 nm Polycarbonat-Filter filtriert. Der Filter wird hiernach einmal mit 1 ml Quench Puffer gewaschen, in Szintillations-Messkammern überführt und mit 5 ml BioSafe II Szintillationslösung versetzt und gevortext. Die Messung erfolgte nach 24 bis 48 h Inkubation. Die Hintergrundaktivität beim Zeitpunkt  $t = 0$  s wurde bestimmt, indem 100 µl Messpuffer und 2 µl Proteoliposomen während der Zugabe von Quench-Puffer gemischt wurden. Zudem werden präformierte Liposomen bei pH 5,5 als Negativkontrolle verwendet.

### Messungen an D46N und wt FucP

Für die Transportassays wurden für die SSM-Messungen präparierte Proteoliposomen verwendet (LPR 5 in *E.coli* polar Lipid Extrakt, 100 mM KPi, pH 7,6; [Seite 43f](#)) und die LPR nachträglich erhöht. Dazu wurden Proteoliposomen (5 mg/ml Lipid, LPR 5) mit präformierten Liposomen verdünnt. Die Probe wurde dann im Wasserbad sonifiziert (30 s), schockgefroren in flüssigem Stickstoff (10 s) und im Wasserbad aufgetaut (3 min). Dieser dreistufige Prozess (im Folgenden *Freeze-Thaw-Sonicate* Zyklus) wurde fünfmal wiederholt, um eine homogene Probe mit erhöhter LPR zu erhalten. Für Potential-getriebene *Uptake* Experimente wurden vor der Durchführung der *Freeze-Thaw-Sonicate* Zyklen zu 10 µl Proteoliposomen 200 µl 10 mg/ml präformierte Liposomen (100 mM KPi, pH 7,6; finale Lipidkonzentration: ca. 10 mg/ml, LPR 205) und 20 µM Valinomycin gegeben. Der Messpuffer (100 mM NaPi, pH 5,5) enthält 0,17 µM  $^{14}\text{C}$  markierte L-Fucose. Für *Counterflow* Experimente wurden vor der Durchführung der *Freeze-Thaw-Sonicate* Zyklen zu 10 µl Proteoliposomen 20 µl 60 mg/ml präformierte Liposomen (100 mM KPi, pH 7,6; finale Lipidkonzentration: ca. 42 mg/ml, LPR 125) und 10 mM L-Fucose gegeben. Der Messpuffer (100 mM KPi, pH 7,6) enthält 0,17 µM  $^{14}\text{C}$  markierte L-Fucose.

Die Messungen wurden durch Zugabe von 4 µl Proteoliposomen zu 200 µl Messpuffer gestartet. Nach Vortexen und Inkubation (3 s bis 45 min) wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml eiskaltem Quench-Puffer (100 mM KPi, pH 5,5, 100 mM LiCl, 10 mM  $\text{MgSO}_4$ ) gestoppt und über Vakuum mit einem 200 nm Polycarbonat-Filter filtriert. Der Filter wurde hiernach einmal mit 3 ml Quench Puffer gewaschen, in Szintillations-Messkammern überführt und mit 5 ml BioSafe II Szintillationslösung versetzt und gevortext. Die Messung erfolgte nach 24 bis 48 h Inkubation. In beiden Experimenten wurden entsprechend beladene präformierte Liposomen bei pH 7,6 als Negativkontrolle verwendet. Die cpm-Werte zu den jeweiligen Zeitpunkten der Negativkontrolle wurden dann von den entsprechenden cpm-Werten aus den Messungen mit Proteoliposomen subtrahiert.

# 3

---

## ERGEBNISSE

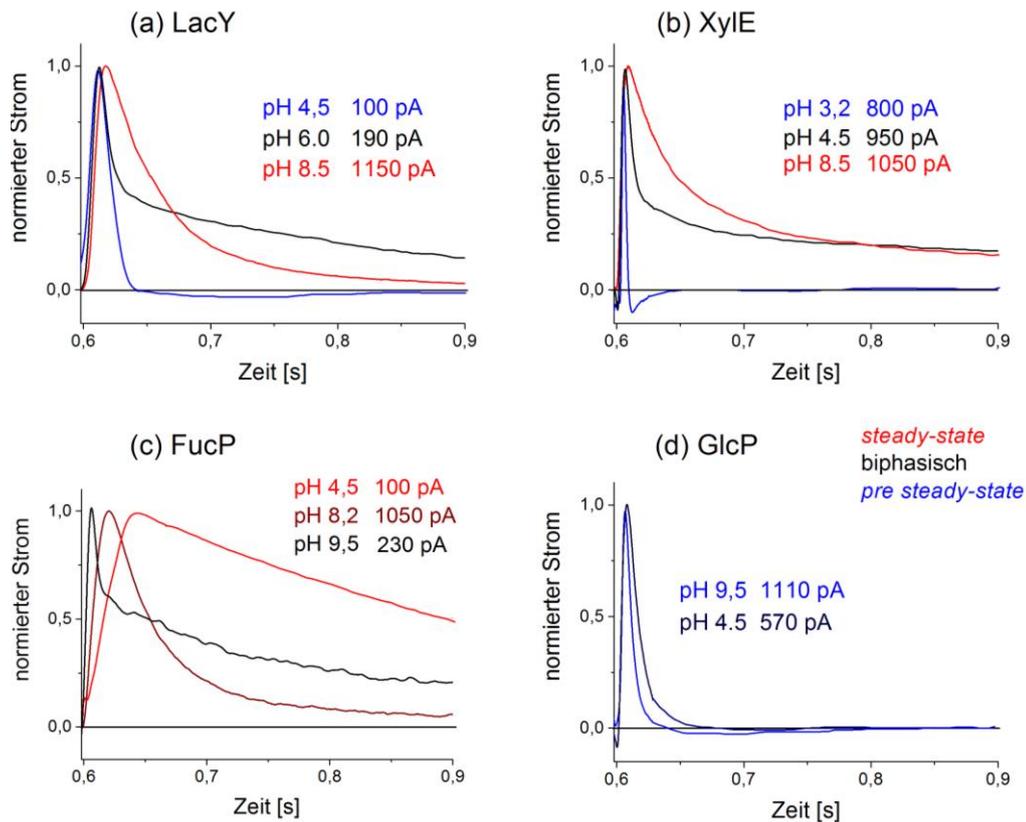
---

### *Steady-state und pre steady-state*

Generell können in allen untersuchten MFS Zucker-Transportern zwei Signale unterschiedlichen Ursprungs detektiert werden: schnelle *pre steady-state* Signale niedriger Elektrogenität und langsame Signale hoher Elektrogenität, die für den *steady-state* Transport charakteristisch sind. Unter Bedingungen, bei denen die Symportrate hoch ist, dominiert in den wt Transportern das *steady-state* Signal, sodass nur eine langsame Komponente sichtbar ist. Im Sauren sowie im Basischen ist der *steady-state* inhibiert, sodass die schnelle *pre steady-state* Komponente sichtbar werden kann.

### **Wt Transporter und *only-Exchange* (OE) Mutanten im Vergleich**

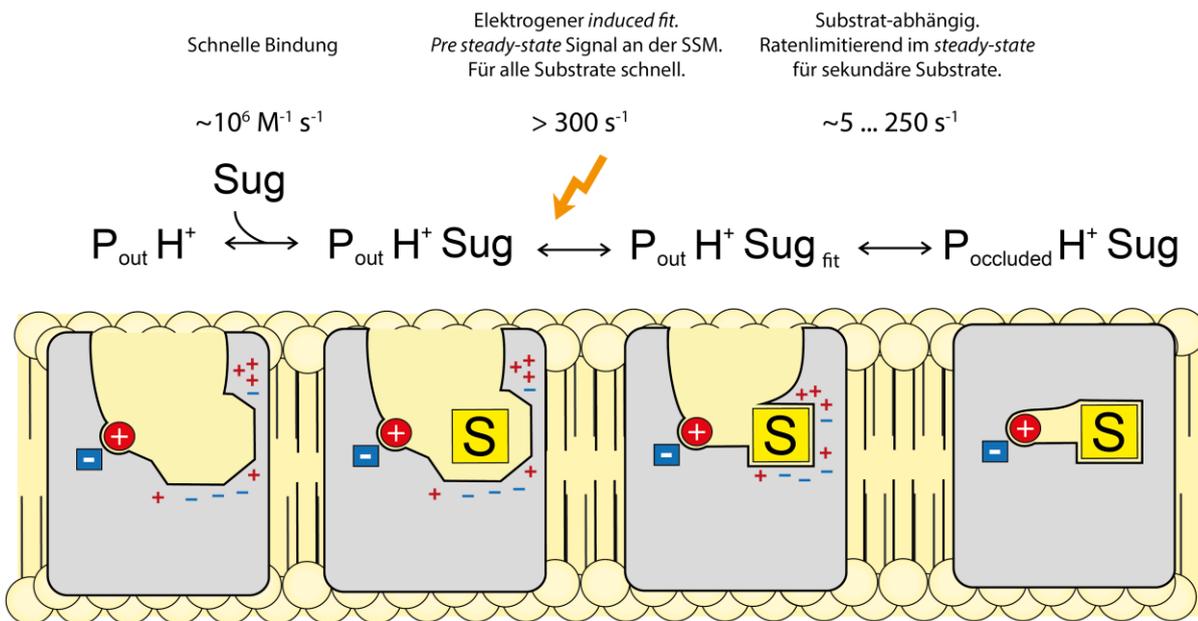
LacY zeigt bei sauren und basischen pH-Werten einen Übergang des monoexponentiell abfallenden langsamen transienten Stroms in ein biphasisches Signal mit einer zusätzlichen schnellen Phase, das bei noch niedrigeren bzw. höheren pH-Werten in einen monoexponentiell abfallenden schnellen transienten Strom übergeht. Für XylE ist das *pre steady-state* Signal lediglich bei sauren pH-Werten zu beobachten, während bei FucP nur bei basischem pH-Wert ein *pre steady-state* Signal detektiert werden kann. GlcP zeigt bei allen symmetrischen (d.h. intraliposomal und extraliposomal identischen) pH-Werten ausschließlich schnelle transiente Ströme. Es konnte unter diesen Bedingungen kein *steady-state* detektiert werden. In [Abbildung 23](#) sind exemplarisch die Unterschiede zwischen *steady-state* und *pre steady-state* Signalen an Setups unterschiedlicher Zeitauflösung dargestellt.



**Abbildung 23: Steady-state, pre steady-state und biphasische Signale für LacY, Xyle, FucP und GlcP auf der SSM.** Steady-state Signale sind rot, pre steady-state Signale blau und biphasische Signale schwarz gezeichnet. Mit Ausnahme des biphasischen Signals in Abbildung (c), das am schnellen Setup aufgenommen wurde, wurden alle transienten Ströme in (a) und (c) am langsamen Setup und alle transienten Ströme in (b) und (d) am schnellen Setup und auf demselben Sensor detektiert. Für alle vier Transporter wird unter bestimmten Bedingungen, wenn der steady-state inhibiert ist, ein Zucker-induziertes pre steady-state Signal detektiert. In wt GlcP ist für alle getesteten, symmetrischen pH-Werte nur das pre steady-state Signal, aber kein steady-state zu sehen. Alle transienten Ströme wurden auf ihren Peakstrom normiert. Die absoluten Peakströme der dargestellten transienten Ströme sind in den Graphen angegeben. Die vollständigen pH-Abhängigkeiten sind auf Seite 102 (Abbildung 34) bzw. Seite 106 (Abbildung 36) für die E.coli Transporter und Seite 118 (Abbildung 41) für GlcP dargestellt.

Damit die pre steady-state Reaktionen in Xyle, LacY und FucP isoliert betrachtet werden können, wurden die putativen Protonenbindestellen in den Transportern durch eine neutrale Aminosäure ausgetauscht. Zwecks Vergleichsstudien wurde ebenso die entsprechende Mutante für GlcP hergestellt. Alle Mutanten katalysieren zwar noch den Zucker-Austausch, aber keinen Protonen-getriebenen Uptake mehr [80, 131, 133, 144]. Wird der Transport im Experiment durch einen Zuckerkonzentrationsprung induziert, findet nur ein Teil des Transportzyklus statt: Zucker-Bindung, Konformationsänderung des beladenen Carriers und Zucker-Freisetzung. Es resultieren schnelle transiente Ströme, die denen in den wt Transportern ähneln. Die pre steady-state Reaktion muss daher mit der Zucker-induzierten Konformationsänderung korrelieren. Für die pre steady-state Reaktion wird folgendes dreistufiges Bindungsmodell angenommen (Abbildung 24). Im ersten Schritt erfolgt die schnelle Zuckerbindung. Es folgt eine langsamere, elektrogene Konformationsänderung, die im Folgenden als induced fit bezeichnet ist. Erst hiernach erfolgt die Konformationsänderung des Transporters, bei der die Substrat-Bindestelle nach innen exponiert wird, wie im Alternating Access

Modell beschrieben. Als Übergangszustand wird ein okkludierter Zustand postuliert, in dem die Substratbindestelle von keiner Seite der Membran zugänglich ist. Der elektrogene *induced fit* könnte auch mit einer Schließung der Bindetasche korrelieren, ein Modell, das an die in der Literatur diskutierten *flexible gates* erinnert [137]. Das Hauptargument für diese Zuordnung ist die Geschwindigkeit der elektrogenen *pre steady-state* Reaktion (Seite 107, Tabelle 20), die zu schnell für die ratenlimitierende Bildung des okkludierten Zustands erscheint (Seite 171, Abbildung 56).



**Abbildung 24: Dreistufige Zucker-induzierte Reaktionsfolge.** Nach der Zuckerbindung in der auswärtsgerichteten Konformation erfolgt der elektrogene *induced fit*, der direkt im Experiment als *pre steady-state* Reaktion detektiert wird (oranger Pfeil). Im Anschluss erfolgt die Bildung des okkludierten Zustandes als hochenergetischer Übergangszustand während der Konformationsänderung in den einwärtsgerichteten Zustand. Die Evidenzen für dieses Modell sind in der Diskussion zusammengefasst (Seite 171, Abbildung 56). Die angegebene Ratenkonstante für die Zuckerbindung wurde Smirnova et al. entnommen [168]. Die Ratenkonstante für den *induced fit* ist eine untere Grenze und durch die Zeitauflösung des Setups limitiert (Seite 107, Tabelle 20). Die Ratenkonstante für die Konformationsänderung des beladenen Carriers wurde für verschiedene Substrate auf Basis der relativen  $v_{max}$ -Werte abgeschätzt (Seite 85, Tabelle 15).

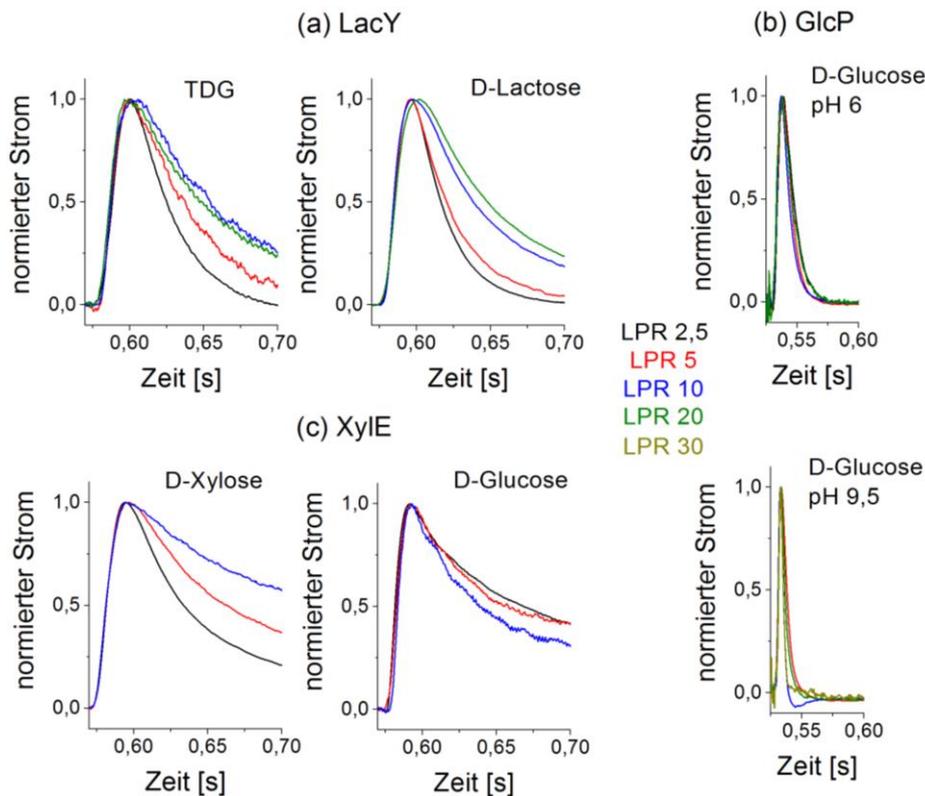
### Variation der LPR: Ein Hinweis auf *steady-state* Signale

Stationärer Transport und *pre steady-state* Ladungsverschiebungen lassen sich dadurch unterscheiden, dass sich bei einem *steady-state* Signal der Peakstrom und die Abklingzeit des transienten Stroms antiproportional zueinander verhalten (Seite 34f). Durch niedrigere LPRs (höhere Transporter-Dichte) ergibt sich für steigende Peakströme ein schnelleres Abklingen des Stroms, weil der Potentialaufbau und die damit verbundene Inhibition des Transports schneller erfolgt. Für *pre steady-state* Reaktionen ist die Abklingzeit eine intrinsische Eigenschaft der beobachteten Reaktion und ermöglicht Rückschlüsse auf ihre Ratenkonstante. Eine niedrigere LPR erhöht den Peakstrom, weil die Ladungsverschiebung größer wird, beeinflusst aber nicht die Abklingzeit des Signals.

Bei den Transportern LacY und Xyle werden die als *steady-state* Signale interpretierten Peakströme durch schnelle *pre steady-state* Signale beeinflusst. Die *pre steady-state* Ströme sind jedoch meist nicht identifizierbar, da sie über einen weiten pH-Bereich durch die größere Elektrogenität der *steady-state* Reaktion überdeckt sind ([Abbildung 23](#)). Daher wird für Messungen an Proteoliposomen mit verschiedenen LPRs eine niedrige Zeitauflösung bevorzugt und ein pH-Wert gewählt, bei dem elektrogene *pre steady-state* Reaktionen nicht signifikant zum Peakstrom beitragen. Eine hohe Zeitauflösung könnte den *pre steady-state* Peakstrom gegenüber dem *steady-state* Peakstrom signifikant erhöhen, wenn die Zeitauflösung die Anstiegszeit des *pre steady-state* Signals limitiert. Sobald der *pre steady-state* Peakstrom einen Einfluss auf das Abklingverhalten des transienten Stroms nimmt, resultieren biphasische Signale, sodass die Abhängigkeit der Abklingzeit von der LPR nicht mehr beurteilt werden kann.

Für die Interpretation der Ergebnisse ist weiterhin wichtig, dass die effektive LPR nicht identisch mit der LPR ist, die im Rekonstitutionsansatz eingestellt wurde. Dies konnte mit elektronenmikroskopischen Gefrierbruchaufnahmen der PM mit rekonstituiertem LacY gezeigt werden, deren Proteindichte für einen LPR 5 Ansatz bei 4.500 Molekülen pro  $\mu\text{m}^2$  und für einen LPR 10 Ansatz bei 1.000 Molekülen pro  $\mu\text{m}^2$  lag [[205](#)]. Mit FucP Proteoliposomen konnten ähnliche Proteindichten erhalten werden ([Seite A20, Abbildung 72](#)). Eine genauere Angabe der effektiven LPR kann der mittlere Peakstrom darstellen. Zumindest dann, wenn über ausreichend viele Messungen an verschiedenen Sensoren gemittelt wurde, um den Einfluss der variierenden Adsorptionseffizienz vernachlässigen zu können. In [Tabelle 13](#) sind daher für jede LPR die mittleren Peakströme den entsprechenden Abklingzeiten gegenübergestellt. Exemplarische transiente Ströme sind in [Abbildung 25](#) dargestellt.

TDG- und Lactose-induzierte Signale an LacY Proteoliposomen unterschiedlicher LPR zeigen eindeutig die für *steady-state* Signale charakteristische Korrelation zwischen Abklingzeit und Peakstrom ([Abbildung 25a](#)). Damit handelt es sich in beiden Fällen um eine Ladungsverschiebung, die einem stationären Transport zuzuordnen ist, wie er für beide Substrate auch in der Literatur beschrieben ist [[225](#)]. Die im Vergleich zu Lactose niedrigere Umsatzrate mit TDG verlangsamt zwar den Aufbau des Potentials, hat aber keinen Einfluss auf die LPR-Abhängigkeit. Für GlcP hingegen ergaben sich selbst für das Hauptsubstrat nur schnelle transiente Ströme ([Abbildung 25b](#)), die auf ein typisches *pre steady-state* Signal hinweisen. Eine Änderung der LPR zeigt keine Änderung der Abklingzeit, sowohl für pH 6,0 als auch für pH 9,5. Dies bestätigt, dass unter den gewählten Bedingungen kein elektrogener stationärer Transport beobachtet wird.



**Abbildung 25: Übersicht repräsentativer auf den Peakstrom normierter transienter Ströme für verschiedene LPRs und Substrate in Sättigung.** LacY und XylE wurden am langsamen, GlcP am schnellen Setup gemessen. Der Farbcode der verwendeten LPRs ist angegeben. Eine Zunahme der Abklingzeit mit steigender LPR deutet auf *steady-state* Signale hin. Dies ist für TDG- und D-Lactose-induzierte Signale an LacY und D-Xylose-induzierte Signale an XylE gegeben. GlcP zeigt in jedem Fall LPR-unabhängige schnelle *pre steady-state* Ströme, während D-Glucose an XylE eine langsame LPR-unabhängige *pre steady-state* Reaktion induziert. Mittelwerte und Standardabweichungen der Peakströme und Abklingzeiten sind in [Tabelle 13](#) dargestellt.

Das Hauptsubstrat von XylE ist D-Xylose. Für sättigende Konzentrationen (30 mM) verhalten sich hier die Peakströme und Abklingzeiten bei verschiedenen LPRs erwartungsgemäß reziprok, was eindeutig auf Transport hinweist ([Abbildung 25c, links](#)). Als Kontrolle wurden zusätzlich Konzentrationen (0,3 mM) unterhalb des KM-Wertes verwendet ([Tabelle 13, rechte Spalte](#)). In diesem Fall bestimmt nicht mehr die elektrogene Reaktion, sondern der Zucker die Umsatzrate. Eine Potential-Abhängigkeit liegt nur dann vor, wenn der elektrogene Schritt im Transportzyklus ratenlimitierend ist. In diesem Fall ist die LPR-Abhängigkeit der Abklingzeit im Vergleich zur Messung mit D-Xylose in Sättigung erwartungsgemäß stark reduziert.

Einen Sonderfall repräsentieren D-Glucose-induzierte Signale an XylE. In Sättigung ist die Abklingzeit mit etwa 35 ms im Rahmen der Standardabweichung unabhängig vom Peakstrom bzw. der LPR ([Abbildung 25c, rechts](#)). Dies würde auf eine langsame *pre steady-state* Reaktion hinweisen und die Ergebnisse der radioaktiven Transportassays bestätigen, die lediglich Glucose-Bindung, aber keinen Transport finden (Uniport-Rate < 1 % im Vergleich zu D-Xylose) [132]. Es ist möglich, dass eine im Vergleich zu D-Xylose geringere Umsatzrate und der dadurch langsamere Potentialaufbau Ursprung

für die fehlende LPR-Abhängigkeit ist. Dies erscheint jedoch deshalb unwahrscheinlich, weil TDG an LacY einen vergleichbaren Peakstrom aufweist und als transportiertes Substrat eine eindeutige LPR-Abhängigkeit zeigt. Es kann deshalb festgehalten werden, dass trotz der Ähnlichkeit zum *steady-state* Signal der D-Xylose bei niedrigen LPRs für D-Glucose ein langsames *pre steady-state* Signal auf der SSM beobachtet wird. Eine nähere Betrachtung Glucose-induzierter Signale an Xyle findet sich in den Ergebnissen auf [Seite 126f.](#)

**Tabelle 13: LPR-Abhängigkeit der Peakströme und Abklingzeiten verschiedener Substrate für Xyle, LacY und GlcP.** Xyle Proteoliposomen wurden für jede LPR an mindestens vier verschiedenen Sensoren gemessen und jeweils Mittelwert und Standardabweichungen für Abklingzeit und Peakstrom angegeben. LacY und GlcP Proben wurden zu vergleichszwecken je LPR nur an einem bis zwei Sensoren gemessen. Die Daten für LacY und Xyle wurden am langsamen Setup aufgenommen, die für GlcP am schnellen Setup. Repräsentative transiente Ströme sind in [Abbildung 25](#) dargestellt.

Transporter	LPR	$\tau_2$ [ms]	$I_P$ [pA]	$\tau_2$ [ms]	$I_P$ [pA]	$\tau_2$ [ms]	$I_P$ [pA]
		D-Xylose 30 mM, pH 7,5		D-Glucose 30 mM, pH 7,5		D-Xylose 0,3 mM, pH 7,5	
Xyle	2,5	35 ± 4	1390 ± 690	32 ± 13	510 ± 310	36 ± 4	390 ± 250
	5	59 ± 6	920 ± 540	31 ± 14	340 ± 200	52 ± 14	320 ± 150
	10	120 ± 12	200 ± 40	35 ± 20	80 ± 10	46 ± 12	70 ± 10
		D-Lactose 100 mM, pH 7,5		TDG 1 mM, pH 7,5			
LacY	2,5	23	2670	29,6	550		
	5	28,2	1330	49	160		
	10	43,1	1140	61,1	150		
	20	52,1	880	63	140		
		D-Glucose 30 mM, pH 6,0		D-Glucose 30 mM, pH 9,5			
GlcP	1	12,7	570	4,8	-1700		
	2,5	12,5 ± 0,4	450 ± 190	3,6 ± 0,2	-630 ± 550		
	5	9	920	5,5	-1320		
	10	8 ± 0,5	530 ± 140	3,4 ± 0,2	-740 ± 50		
	20	12 ± 1,2	160 ± 120	3,8 ± 0,4	-260 ± 170		
	30	8 ± 3,3	150 ± 40	4 ± 1,6	-190 ± 130		

## Zucker-Spezifität in *E.coli* Transportern

Verschiedene Zucker induzieren in wt Transportern Konzentrations-abhängige Ströme, aus denen KM- und v<sub>max</sub>-Werte abgeleitet werden können. Die *pre steady-state* Signale der OE-Mutanten ermöglicht hingegen die Bestimmung von KD-Werten und Ladungsverschiebungen während des *induced fits* des Zuckermoleküls. Diese Parameter ermöglichen Rückschlüsse über die Substratspezifität. Die pH-Abhängigkeit der KM-Werte gibt darüber hinaus Informationen über die Kopplung zwischen Zucker- und Protonentranslokation.

## Zucker-Spezifität der wt Transporter

Auf Basis von Messreihen mit verschiedenen Substratkonzentrationen konnten  $K_M$ -Werte aus den *steady-state* Signalen von LacY, FucP und XylE bestimmt werden. Exemplarische Konzentrationsabhängige transiente Ströme und die hyperbolischen Fits der Peakströme sind in [Abbildung 26](#) dargestellt. Die  $K_M$ -Werte der Hauptsubstrate sowie sekundären Substrate aller drei Transporter liegen für jeden getesteten pH-Wert im niedrigen millimolaren Bereich. Für die Hauptsubstrate sind  $K_M$ -Werte auch in der Literatur zu finden. Diese wurden in Transportassays mit radioaktiv markierten Substraten, entweder mit oder ohne anliegendes Membranpotential bestimmt. Die  $K_M$ -Werte sind bei anliegendem Membranpotential für LacY mit 0,2 - 0,3 mM [[123](#), [226](#)], für FucP mit 30  $\mu$ M [[227](#)] und für XylE mit 0,1 mM [[228](#)] wesentlich niedriger als die auf der SSM bestimmten  $K_M$ -Werte (LacY: 5 mM; FucP: 0,9 mM; XylE: 2 mM). Ohne anliegendes Membranpotential stimmen die  $K_M$ -Werte aus der Literatur für XylE mit 0,5 mM [[129](#)] und LacY mit 0,5 - 2 mM [[162](#)] mit denen aus den SSM-Messungen näherungsweise überein. Da im SSM-Experiment kein Potential anliegt, ist dieser Vergleich besser geeignet. Vergleiche sind immer nur dann möglich, wenn die Parameter unter identischen experimentellen Bedingungen bestimmt wurden, wie verschiedene Experimente an LacY zeigen [[73](#), [229](#)].

### Bestimmung der $K_M$ -Werte: Michaelis-Menten- oder Hill-Fit

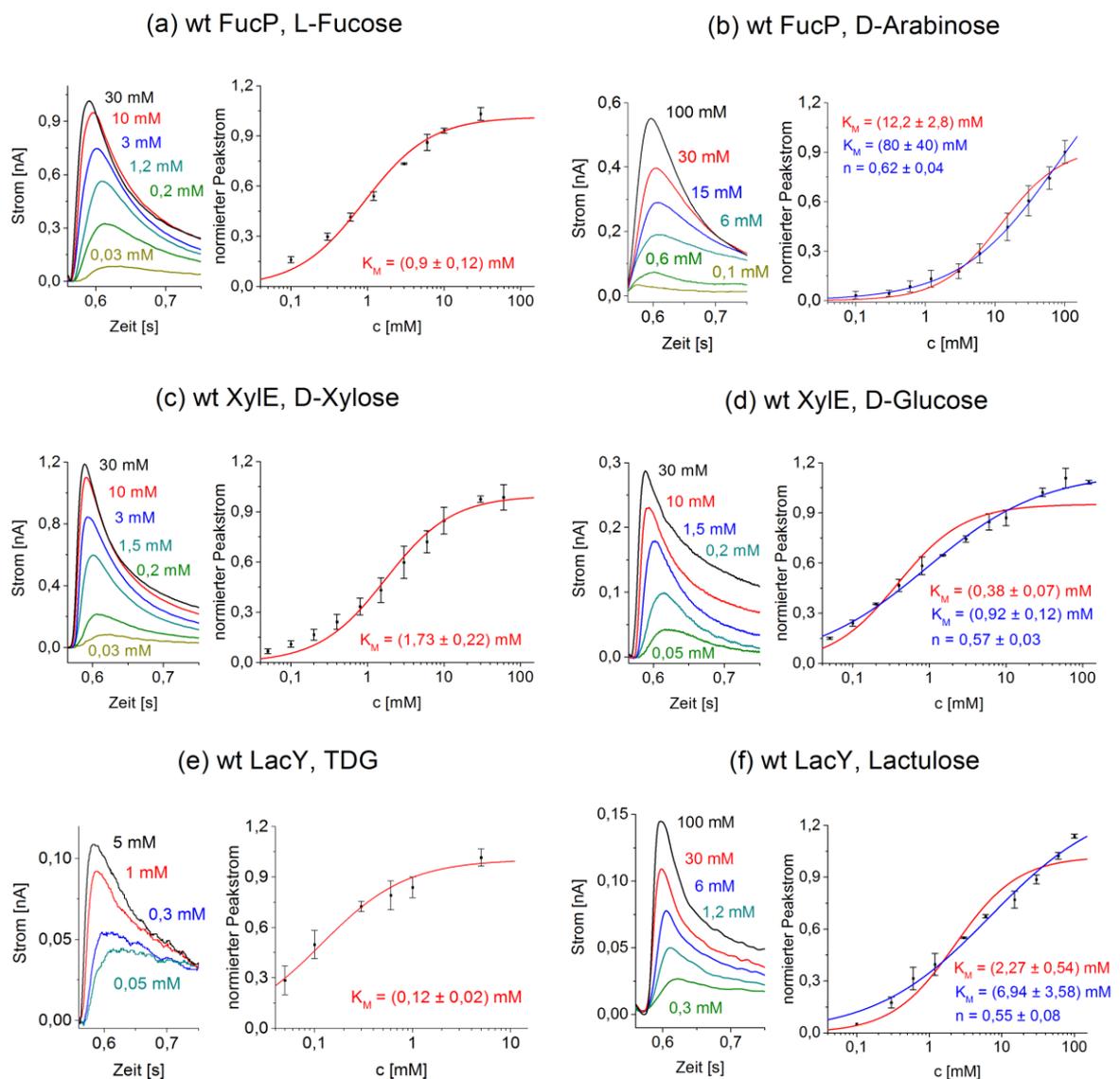
Es ist auffällig, dass für einige sekundäre Substrate, insbesondere D-Glucose an XylE, Lactulose an LacY und D-Arabinose an FucP, die Anpassung des Datensatzes mit der Michaelis-Menten Gleichung die Datenpunkte nicht gut annähert ([Abbildung 26b,d,f](#)). In diesen Fällen führt eine Anpassung mit der Hill-Gleichung unter Berücksichtigung einer negativen Kooperativität ( $n \approx 0,5$ ) zu einer genaueren Einschätzung des  $K_M$ -wertes. Mit einem Hill-Fit ähneln die  $K_M$ -Werte von Lactulose (6,9 mM statt 2,3 mM) und D-Glucose (0,9 mM statt 0,4 mM) auch denen der jeweiligen Hauptsubstrate D-Lactose (5,3 mM) und D-Xylose (1,7 mM). Das in [Abbildung 26b,d](#) sichtbare Verhalten kann auch bei monomeren Transportern mit nur einer Substratbindestelle beobachtet werden, wenn der Transporter in verschiedenen Populationen, einer katalytisch aktiven Form PH ([Gleichung G58](#)) und einer katalytisch inaktiven Form P ([Gleichung G59](#)), zur Bindung des Substrats S fähig ist [[230–232](#)].



mit  $K_1 \ll K_2$

Wenn die Konformationsänderung von PS zu PSH (mit der Gleichgewichtskonstante  $K_1$ ) langsam gegenüber der ratenlimitierenden Reaktion im Transportzyklus (mit der Gleichgewichtskonstante  $K_2$ )

ist, ergibt sich ein Einfluss auf die Substrat-Abhängigkeit der Umsatzrate, der einer negativen Kooperativität gleicht. Dieser Einfluss ist umso größer, je kleiner  $K_1$  gegenüber  $K_2$  ist [233]. Tatsächlich konnte für LacY gezeigt werden, dass Substrate sowohl an den protonierten als auch an den unprotonierten Carrier binden können [164]. Eine Protonierung nach der Zuckerbindung ist unwahrscheinlich, da der Zucker die Protonenbindestelle blockiert [135]. Die Evidenzen für ein solches Bindungsmodell sind in der Diskussion auf Seite 151f beschrieben. Für  $K_2/K_1 < 10$  ist kaum ein Effekt auf die Konzentrationsabhängigkeit erkennbar [233]. Möglicherweise ist das Verhältnis  $K_2/K_1$  für D-Glucose, Lactulose und D-Arabinose wesentlich höher als für die übrigen Substrate, sodass der Einfluss auf die Kinetik im Hill-Fit nur bei diesen Substraten erkennbar wird. Im Folgenden werden jedoch ausschließlich die  $K_M$ -Werte aus dem Michaelis-Menten-Fit betrachtet.



**Abbildung 26: Konzentrations-Abhängigkeit der transienten Ströme (links) und dazugehörige  $K_M$ -Plots der Peakströme (rechts) für verschiedene Substrate und Transporter bei pH 7,6.** Unter anderem für D-Glucose an XyleE eignet sich der Hill-Fit (blaue Kurve) besser als der Michaelis-Menten-Fit (rote Kurve) zur Beschreibung des tatsächlichen  $K_M$ -Wertes (Seite 55, Gleichungen G32 und G33). Da kein Modell für einen Hill-Fit gefunden werden konnte, sind im Folgenden lediglich die  $K_M$ -Werte der Michaelis-Menten-Fits gegenübergestellt.

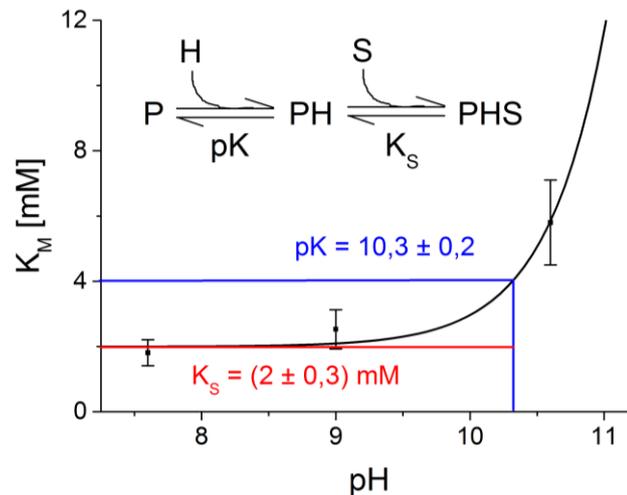
**Die KM-Werte steigen mit dem pH-Wert**

Für LacY, XylE und FucP ist eine Erhöhung der KM-Werte mit steigendem pH-Wert zu beobachten (Tabelle 14). Insbesondere bei stark basischen pH-Werten resultiert ein signifikanter Anstieg des KM-Wertes, wie für XylE und D-Xylose bei pH 10,6 sichtbar wird. Die Protonierung der Transporter begünstigt damit die Zuckerbindung. Dies deutet darauf hin, dass die Substrat-Bindung an den unprotonierten Carrier mit einer niedrigeren Affinität stattfindet. Bestätigt wird dies durch Messungen an LacY: Die Ratenkonstante  $k_r$  der Zuckerbindung steigt mit einem  $pK > 10,5$  rapide an [164, 169], was den KD-Wert im Basischen erhöht. Diese Beobachtung führte zu der These, dass der Carrier protoniert sein muss, bevor der Zucker binden kann.

Auf Basis der pH-Abhängigkeit der KM-Werte können  $pK$ - sowie  $K_S$ -Werte der Zuckerbindung bestimmt werden. Für XylE wurde dazu die pH-Abhängigkeit der KM-Werte (Abbildung 27) mit einer Modelfunktion angepasst (Seite 58, Gleichung G45). Diese nimmt dem MKM entsprechend an, dass die Protonenbindung der Zuckerbindung vorausgeht. Damit wäre die Erhöhung des KM-Wertes im Basischen auf eine reduzierte Population des protonierten Transporters zurückzuführen. Es ist anzumerken, dass dieses Modell die pH-Abhängigkeit des *steady-states* nicht hinreichend erklärt, da mit basischem pH-Wert nicht nur der KM-Wert steigt, sondern auch  $v_{max}$  reduziert wird (Seite 102, Abbildung 34). Dennoch lässt sich mit diesem Modell der  $pK$ -Wert der Zuckerbindung bestimmen. Der  $K_S$ -Wert ergibt sich zu 2 mM. Er entspricht dem Modell gemäß dem KM-Wert, wenn die gesamte auswärtsgerichtete Transporter-Population im protonierten Zustand vorliegt. Mit einem  $pK$ -Wert von 10,3 sinkt die Transporter-Population im protonierten Zustand und der KM-Wert steigt an.

**Tabelle 14: pH-Abhängigkeit der ermittelten KM-Werte für die Hauptsubstrate von LacY, FucP und XylE.** Die KM-Werte bei verschiedenen pH-Werten wurden an unterschiedlichen Sensoren ermittelt.

Transporter	pH	Substrat	KM [mM]	$v_{max}$ [nA]
LacY [205]	6,6	D-Lactose	$4,3 \pm 0,8$	$0,3 \pm 0,1$
	7,6	D-Lactose	$5,3 \pm 0,5$	$0,7 \pm 0,2$
	8,5	D-Lactose	$6,9 \pm 0,7$	$1,3 \pm 0,3$
FucP	7,6	L-Fucose	$0,9 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,5$
	9,0	L-Fucose	$1,5 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,1$
XylE	7,6	D-Xylose	$1,7 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,5$
	9,0	D-Xylose	$2,5 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,4$
	10,6	D-Xylose	$5,8 \pm 1,2$	$0,8 \pm 0,2$



**Abbildung 27: pH-Abhängigkeit der  $K_M$ -Werte für den Transport von D-Xylose in wt Xyle.** Die Datenpunkte aus [Tabelle 14](#) wurden mithilfe einer Modellgleichung ([Seite 58, Gleichung G45](#)) angepasst. Diese nimmt dem MKM gemäß eine strikte Reihenfolge von Protonen- und Zuckerbindung an.  $K_S$ -Wert und  $pK$ -Wert der Zuckerbindung sind angegeben.

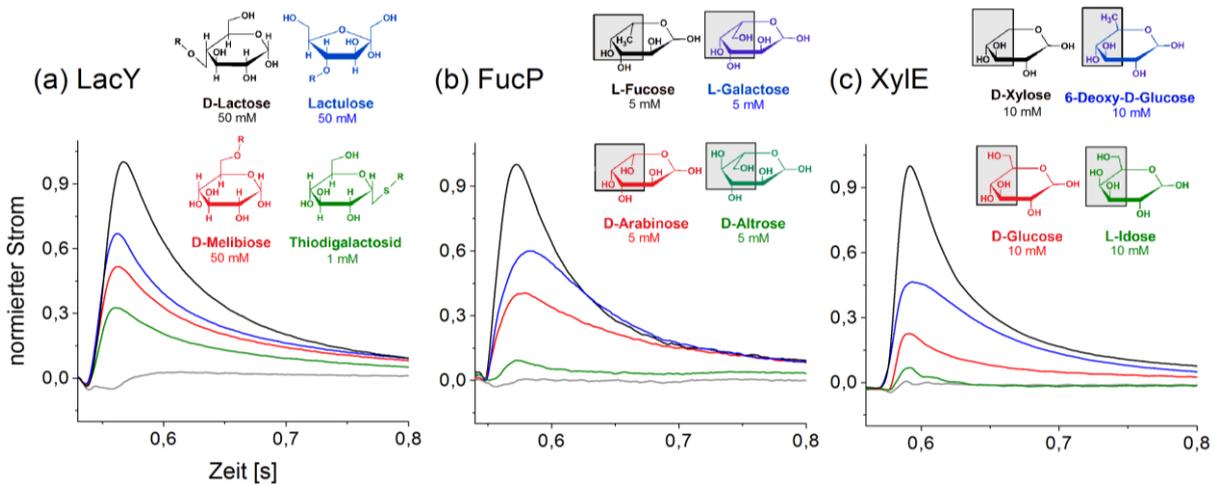
### **Verschiedene Substrate zeigen abweichende $K_M$ - und $v_{max}$ -Werte**

Um die Frage der Substratspezifität zu klären, wurden für die einzelnen wt Transporter verschiedene Substrate in niedrigen millimolaren Konzentrationen am selben Sensor gemessen ([Abbildung 28](#)). Die entsprechenden Hauptsubstrate des jeweiligen Transporters (D-Lactose, L-Fucose und D-Xylose) zeigten im Vergleich zu den getesteten sekundären Substraten immer den größten Peakstrom. Insgesamt findet sich eine Übereinstimmung der über SSM-Messungen gefundenen Substratspezifität mit der aus radioaktiven Transportassays. Dies gilt sowohl für den Transport von Melibiose [\[226\]](#), Lactulose [\[234\]](#) und TDG [\[225\]](#) durch LacY als auch für den Transport von L-Galactose und D-Arabinose durch FucP [\[227, 235\]](#). Bisher unbekannte Substrate für FucP und Xyle sind D-Altrose bzw. 6-Desoxy-D-Glucose und L-Idose.

Eine Besonderheit in den Substrat-Abhängigkeiten ist der langsame transiente Strom, der durch eine Reaktion von D-Glucose mit Xyle induziert wird ([Abbildung 28c](#)). In radioaktiven Transportassays bindet D-Glucose zwar an Xyle, wird aber nicht transportiert [\[132, 236\]](#). Die Messungen an Proteoliposomen mit verschiedenen LPRs zeigen demgemäß, dass es sich um ein langsames *pre steady-state* Signal handelt, trotz seiner Ähnlichkeit zu den *steady-state* Signalen der übrigen Substrate und Transporter ([Seite 79, Tabelle 13](#)).

Auf Basis der Strukturen von Substraten und Nichtsubstraten lassen sich Substratteilstrukturen identifizieren, die für die Substraterkennung durch die Transporter erforderlich sind. Je mehr die Struktur des Substrats von der Grundstruktur des Hauptsubstrats abweicht, desto geringer wird der Peakstrom. So ist die stereochemische Konfiguration von C1 bis C3 des jeweiligen Hauptsubstrats in FucP und Xyle essentiell für die Erkennung. Für FucP wurden L-Glucose, D-Galactose, L-Arabinose und Rhamnose, für Xyle L-Glucose und L-Arabinose eindeutig als Nichtsubstrate identifiziert ([Daten nicht](#)

gezeigt). Wird die stereochemische Konfiguration des C4 verändert (D-Altrose bei FucP und L-Idose bei Xyle) resultieren mit unter 10 % des Peakstroms des jeweiligen Hauptsubstrats die niedrigsten Peakströme. Für LacY wurde bereits beschrieben, dass die Anwesenheit und Orientierung der OH-Gruppe an C4 entscheidend für die Transportfunktion ist [237]. Das Hinzufügen einer OH-Gruppe an C6 (L-Galactose bei FucP), die Substitution der C6-Methylgruppe durch eine OH-Gruppe (D-Arabinose bei FucP) und das Hinzufügen einer Methyl-Gruppe an C5 (6-Desoxy-D-Glucose bei Xyle) reduziert den Peakstrom im Vergleich zum Hauptsubstrat um etwa 50 %.



**Abbildung 28: Substrat-Abhängigkeit der transienten Ströme für LacY (pH 7,6), FucP (pH 8,0) und Xyle (pH 7,0).** In grau sind die induzierten Ströme von Nicht-Substraten dargestellt (D-Glucose bei FucP und Xyle, Saccharose bei LacY). In den Haworth-Strukturen ist jeweils markiert, welcher Teil des Zuckers verändert ist. Die dargestellten transienten Ströme zeigen, dass unterschiedliche Substrate bei identischen Konzentrationen im niedrigen millimolaren Bereich unterschiedliche Peakströme induzieren. Prinzipiell könnte dies durch unterschiedliche  $K_M$ -Werte (Substrate haben verschiedene Affinitäten) oder verschiedene  $v_{max}$ -Werte (Substrate beeinflussen die Ratenkonstanten der ratenlimitierenden Reaktion) der Substrate zurückzuführen sein (Tabelle 15).

Als Substratspezifität wird im Folgenden die Fähigkeit eines Transporters verstanden zwischen verschiedenen Substraten zu unterscheiden. Dies kann sowohl auf Ebene der Substratbindung über verschiedene Affinitäten als auch auf Ebene der Substrattranslokation über verschiedene Ratenkonstanten der geschwindigkeitsbestimmenden Reaktion im Transportzyklus erreicht werden. Die Substratspezifität kann also thermodynamisch über die Energieniveaus im Zucker-gebundenen Zustand oder kinetisch über verschiedene Aktivierungsenergien für die verschiedenen Substrate reguliert sein. In der Enzymkinetik wird häufig der Spezifitätskoeffizient  $k_{cat}/K_M$  verwendet, um die Substratspezifität zu definieren [238]. Da  $1/K_M$  meist ein grober Indikator für die Affinität darstellt, steigt der Spezifitätskoeffizient bei hoher Umsatzrate und hoher Affinität an. Ein großes  $k_{cat}/K_M$  bedeutet daher gewöhnlicherweise eine bessere enzymatische Leistung. Im Folgenden soll der Spezifitätskoeffizient für die verschiedenen Substrate der *E.coli* Transporter betrachtet werden.

Zur Bestimmung von  $v_{max}$ - und  $K_M$ -Werten wurde für ausgewählte Substrate die Konzentrations-Abhängigkeit bestimmt. Der in Tabelle 15 angegebene prozentuale  $v_{max}$ -Wert der einzelnen

Substrate entspricht der Umsatzrate unter sättigenden Substratkonzentrationen relativ zum Hauptsubstrat. LacY und FucP unterscheiden sich in einem entscheidenden Punkt voneinander. In LacY zeigt das Hauptsubstrat die größte Umsatzrate, aber den höchsten KM-Wert. In FucP zeigt das Hauptsubstrat die niedrigste Umsatzrate, aber den kleinsten KM-Wert. Für den Transport von Lactulose und TDG durch LacY bestimmt damit nicht wie für den Transport von D-Lactose die Protonenfreisetzung die Umsatzrate, sondern eine Reaktion im Zucker-Translokationsweg (Zuckerbindung, Konformationsänderung des beladenen Carriers, Zuckerfreisetzung). Im Gegensatz dazu ist die Substratspezifität bei FucP über Unterschiede in der Zuckeraffinität reguliert. Die Substrate L-Galactose und D-Arabinose haben eine niedrigere Affinität zum Transporter als L-Fucose. Bei sehr hohen Konzentrationen, die *in vivo* sehr wahrscheinlich nicht erreicht werden, ergibt sich jedoch eine Transportrate, welche die von L-Fucose in Sättigung sogar übersteigt. Eine Betrachtung von Xyle ist in diesem Kontext nicht möglich. Es wurde gezeigt, dass die Peakströme von D-Glucose nicht proportional zu den *steady-state* Raten sind (Seite 79, Tabelle 13). Auf Basis des SSM-Experiments ist nicht zu bewerten, ob 6-Desoxy-D-Glucose und L-Idose langsame *pre steady-state* Signale wie D-Glucose oder *steady-state* Signale wie D-Xylose induzieren.

**Tabelle 15: KM- und v<sub>max</sub>-Werte für verschiedene Substrate von LacY, FucP und Xyle.** KM- und v<sub>max</sub>-Werte wurden aus einem hyperbolischen Fit mit Michaelis-Menten Gleichung wie in [Abbildung 26](#) dargestellt ermittelt. Der v<sub>max</sub>-Wert entspricht dem Mittelwert aus mindestens drei verschiedenen Messreihen. Die Angabe für die sekundären Substrate erfolgt in Prozent im Vergleich zum jeweiligen v<sub>max</sub>-Wert des Hauptsubstrats (100 %). Dazu wurde für jede Messreihe eines sekundären Substrats auch der Peakstrom für das Hauptsubstrat gemessen und mittels KM-Gleichung das entsprechende v<sub>max</sub> bestimmt. Die Prozentangabe vergleicht damit sowohl für das sekundäre Substrat als auch für das Hauptsubstrat die Sättigungswerte der hyperbolen Fits. In der letzten Spalte ist der Spezifitätskoeffizient als v<sub>max</sub>/KM angegeben. Rot markiert sind jeweils die niedrigsten KM-Werte, die höchsten v<sub>max</sub>-Werte und die höchsten Spezifitätskoeffizienten eines Transporters. 1: Für D-Glucose sind KM- und v<sub>max</sub>-Wert keine Charakteristika des *steady-states* (Seite 78, [Abbildung 25](#)). Für 6-Desoxy-D-Glucose kann keine Aussage getroffen werden, ob es sich um *steady-state* oder *pre steady-state* Signale handelt. Für alle anderen aufgeführten Substrate wurde in der Literatur bereits stationärer Transport gezeigt, weshalb die ermittelten KM- und v<sub>max</sub>-Werte den stationären Transport beschreiben.

Transporter	pH	Substrat	KM [mM]	v <sub>max</sub>	v <sub>max</sub> /KM
LacY	7,6	D-Lactose	5,3 ± 0,5	<b>0,7 ± 0,2 nA</b>	0,13
	7,6	Lactulose	2,3 ± 0,6	71 ± 8 %	0,22
	7,6	TDG	<b>0,12 ± 0,02</b>	21 ± 1 %	<b>1,23</b>
FucP	7,6	L-Fucose	<b>0,9 ± 0,1</b>	0,5 ± 0,2 nA	<b>0,56</b>
	7,6	L-Galactose	7,4 ± 1,3	123 ± 8 %	0,08
	7,6	D-Arabinose	12,2 ± 2,8	<b>132 ± 13 %</b>	0,05
Xyle	7,6	D-Xylose	1,7 ± 0,2	<b>1,8 ± 0,5 nA</b>	1,06
	7,6	6-Desoxy-D-Glucose <sup>1</sup>	<b>0,2 ± 0,05</b>	35 ± 5 %	<b>3,15</b>
	7,6	D-Glucose <sup>1</sup>	0,4 ± 0,1	26 ± 5 %	1,17

Für FucP zeigt der Spezifitätskoeffizient deutlich, dass L-Fucose das Hauptsubstrat darstellt. In LacY hat TDG trotz niedriger Umsatzrate aufgrund der hohen Affinität den höchsten Spezifitätskoeffizienten. Welche Substrate eines Transporters *in vivo* tatsächlich transportiert

werden, ist aber insbesondere auch von den Substratkonzentrationen abhängig. Die hohen Spezifitätskoeffizienten von TDG und Lactulose dürfen daher nicht fehlinterpretiert werden. Beide Substrate sind synthetisch: TDG wird als Inhibitor für Galektine verwendet [239], während Lactulose ebenfalls als Medikament eingesetzt wird [240]. Auch die hohen Spezifitätskoeffizienten für D-Glucose und 6-Desoxy-D-Glucose dürfen nicht fehlinterpretiert werden, da es sich zumindest bei dem  $v_{max}$ -Wert von D-Glucose nicht um den  $v_{max}$ -Wert im *steady-state* Symport handelt (Seite 79, Tabelle 13).

### Zucker-Spezifität der OE-Mutanten: KD-Werte und Ladungsverschiebungen

Durch Messungen von E325A LacY und D27N XylE mit verschiedenen Substratkonzentrationen können die KD-Werte für die Zuckerbindung bestimmt werden (Abbildung 29, Tabelle 16). Sie liegen ähnlich wie die KM-Werte des *steady-states* (siehe oben) im niedrigen millimolaren Bereich. Mit isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) und *Labeling*-Experimenten wurden für die Hauptsubstrate von XylE (0,4 mM) [132] und LacY (1 - 10 mM) [170, 172, 241] ähnliche KD-Werte bestimmt wie im SSM-Experiment (XylE: 1 mM; LacY: 20 mM). Für FucP (0,5 mM) [131] konnte aufgrund der niedrigen Elektrogenität des *pre steady-state* Signals kein Vergleichswert auf der SSM abgeleitet werden. Auch für die sekundären Substrate stimmen die ermittelten KD-Werte gut mit den Literaturwerten überein. Für die Bindung von D-Glucose an XylE wurde mittels ITC ein KD-Wert von 0,77 mM bestimmt [132]. Auf der SSM ergibt sich ein KD-Wert von 1,9 mM. Für die Bindung von TDG an LacY wurden KD-Werte von 3 - 80  $\mu$ M [125, 242] gefunden. Auf der SSM ergibt sich der KD-Wert zu 180  $\mu$ M.

Bei *pre steady-state* Reaktionen kann eine Veränderung des Peakstroms sowohl auf eine veränderte effektive Rate der Reaktion als auch auf eine Veränderung der Reaktion an sich hinweisen. Eine veränderte effektive Rate würde die Abklingzeiten der transienten Ströme beeinflussen (Seite 36, Gleichung G22). Eine Veränderung der Reaktion an sich bedeutet, dass die Positionen der Ladungsträger nach dem *induced fit* abhängig vom Substrat sind. In diesem Fall würden sich unterschiedliche Ladungsverschiebungen für die verschiedenen Substrate ergeben.

Verschiedene Substrate in Sättigung induzieren transiente Ströme, deren Abklingzeiten identisch sind (Tabelle 16). Artefakt-Messungen mit  $KClO_4$  zeigen, dass diese Abklingzeit von der Zeitauflösung des Systems limitiert ist (Seite 45, Abbildung 14). Bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen insbesondere für D27N XylE steigt dann wie erwartet die Abklingzeit  $\tau_2$  bei sinkendem Peakstrom (Abbildung 29). Die Abnahme des Peakstroms korreliert mit der Abnahme der effektiven Rate des *induced fits*. Bei niedrigen Substratkonzentrationen ist die Zeitauflösung also nicht mehr limitierend, sodass die tatsächliche effektive Rate ermittelt werden könnte. In anderen Fällen, insbesondere bei

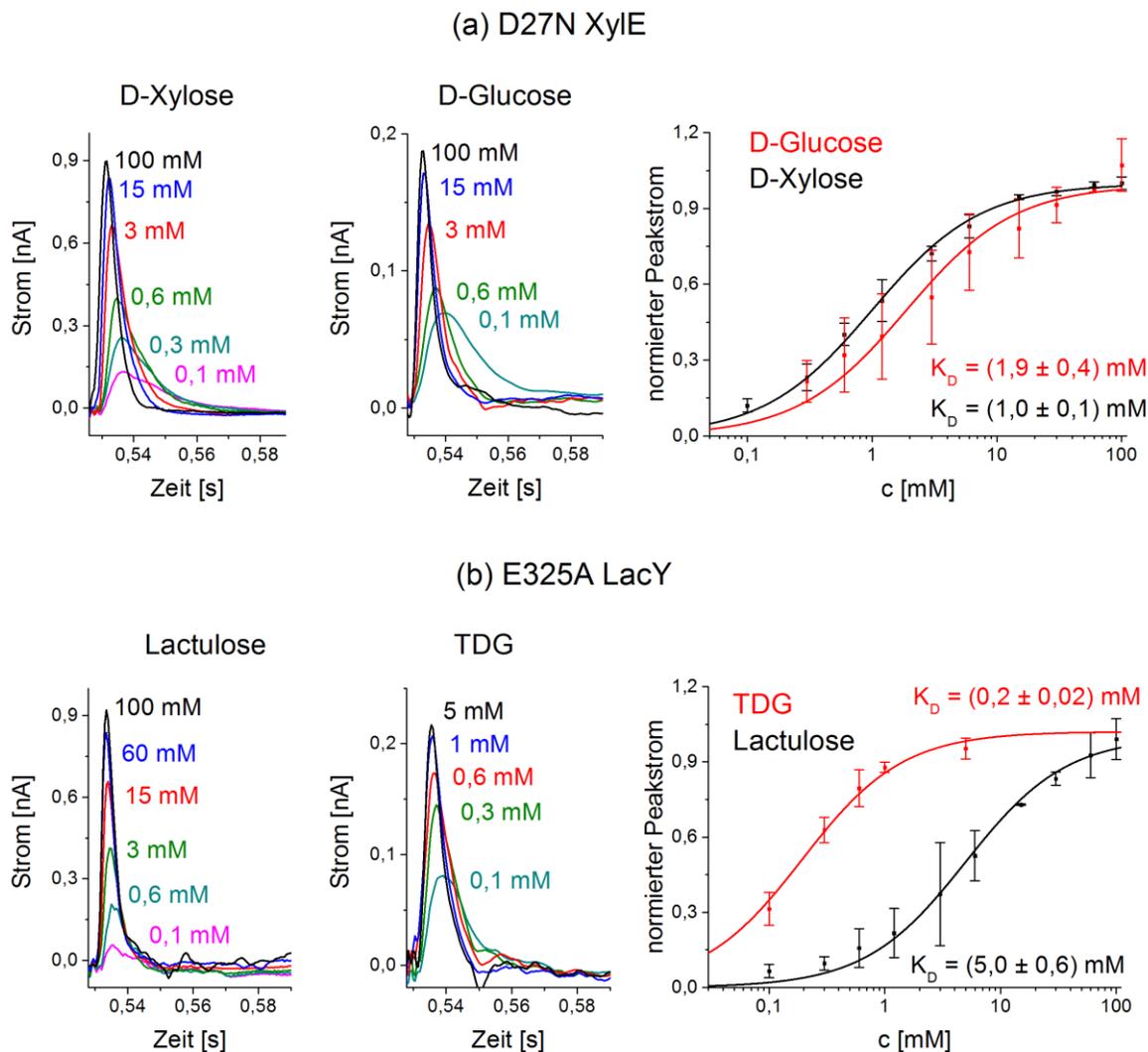
E325A LacY, ist  $\tau_2$  unabhängig von der Substratkonzentration. In E325A LacY ist für alle Substratkonzentrationen die Zeitauflösung des Systems limitierend für die Abklingzeit des *pre steady-state* Signals. Dies weist darauf hin, dass die Reaktion in LacY schneller ist als die in XylE. Die detektierte Ladung bzw. das Peak-Integral sinkt im Gegensatz zu der Abklingzeit stetig bei niedrigeren Substratkonzentrationen, da unterhalb der Sättigungskonzentration eine geringere Transporter-Population in den Substrat-gebundenen Zustand übergeht.

**Tabelle 16: KD-Werte für Haupt- und sekundäre Substrate, abgeleitet aus der Konzentrations-Abhängigkeit der *pre steady-state* Komponente.** Zu Vergleichszwecken sind I<sub>max</sub>-Werte, Abklingzeiten der transienten Ströme und Ladungsverschiebungen (Peak-Integrale) dargestellt. Der I<sub>max</sub>-Wert entspricht dem Mittelwert aus mindestens drei Messreihen. Die Angabe für die sekundären Substrate erfolgt in Prozent im Vergleich zum jeweiligen I<sub>max</sub>-Wert des Hauptsubstrats (100%). Dazu wurde für jede Messreihe eines sekundären Substrats auch der Peakstrom für das Hauptsubstrat gemessen und mittels KM-Gleichung das entsprechende I<sub>max</sub> bestimmt. Die Prozentangabe vergleicht damit sowohl für das sekundäre Substrat als auch für das Hauptsubstrat die Sättigungswerte der hyperbolen Fits. Die Abklingzeiten und Ladungsverschiebungen wurden aus den Strömen mit maximaler Substratkonzentration abgeleitet (30 mM in XylE, 100 mM in LacY). Für LacY und XylE sind die Abklingzeiten für alle Substrate im Rahmen der Standardabweichung identisch, weil die Zeitauflösung des Setups die Messung limitiert (KClO<sub>4</sub>-Sprünge bei p = 0,3 bar ergeben  $\tau_2 = (3,5 \pm 1)$  ms; [Seite 45, Abbildung 14](#)). Die für die Substrate unterschiedlichen I<sub>max</sub>-Werte sind demnach sehr wahrscheinlich auf Änderungen in der Ladungsverschiebung zurückzuführen.

Transporter	pH	Substrat	KD [mM]	I <sub>max</sub>	$\tau_2$ [ms]	Q [pC]
E325A LacY	7,6	D-Lactose	20 ± 3	0,44 ± 0,18 nA	3,4 ± 0,9	3,1 ± 1,8
	7,6	Lactulose	4,6 ± 0,8	80 ± 8 %	4,2 ± 1,5	2,9 ± 1,8
	7,6	TDG	0,18 ± 0,03	28 ± 8 %	4,3 ± 1,4	0,5 ± 0,6
D27N XylE	7,6	D-Xylose	1,0 ± 0,1	1,03 ± 0,2 nA	3,3 ± 0,1	6,8 ± 1,5
	7,6	D-Glucose	1,9 ± 0,35	19 ± 2 %	3 ± 0,2	1,1 ± 0,3

Warum induzieren verschiedene Substrate unterschiedliche Peakströme unter sättigenden Bedingungen? Da unter sättigenden Bedingungen alle Transporter in den Substrat-gebundenen Zustand übergehen, können die unterschiedlichen Peakströme nur durch eine Veränderung der Reaktion an sich, also verschiedene Ladungsverschiebungen erklärt werden. Jedes Substrat induziert eine andere Bewegung von Ladungsträgern im Protein, die am *induced fit* beteiligt sind. Für verschiedene Substrate unterscheiden sich damit die Koordinaten der Ladungsträger nach dem *induced fit* voneinander. Diese Unterschiede korrelieren aber nicht mit den verschiedenen Affinitäten für die Substrate ([Tabelle 16](#)). So zeigt TDG an E325A LacY eine niedrigere Ladungsverschiebung und einen niedrigeren KD-Wert, während D-Glucose an D27N XylE eine niedrigere Ladungsverschiebung und einen höheren KD-Wert aufweist. Es handelt sich um einen alternativen Transporter-Zustand nach der Zuckerbindung. Diese Interpretation der *pre steady-state* Ladungsverschiebung durch verschiedene Substrate ist auch kompatibel mit den 3D-Strukturen. Eine Analyse der Interaktionsnetzwerke verschiedener Substrat-gebundener Konformationen zeigt, dass jedes Substrat einen anderen Transport-Zustand induziert ([Seite A10, Abbildung 65](#)).

Ein Vergleich zwischen den Ladungsverschiebungen in den OE-Mutanten und der *steady-state* Peakströme in wt Transportern zeigt eine interessante Korrelation. Die Substrate, die in den wt Transportern geringere *steady-state* Peakströme induzieren, zeigen in den Mutanten auch eine erhebliche Veränderung im *induced fit*, also eine geringere Ladungsverschiebung gegenüber der des Hauptsubstrats. Dies wird besonders deutlich bei TDG an LacY und D-Glucose an XylE. So zeigt TDG bei pH 7,6 in wt LacY nur etwa 21 % der Transportrate, die durch Lactose in Sättigung induziert wird. Gleichzeitig zeigt der TDG-induzierte Peak in E325A LacY nur 28 % des Stroms im Vergleich zum Lactose-induzierten Peak, was qualitativ auf eine erhebliche Veränderung des *induced fits* hinweist. Ähnliche Verhältnisse ergeben sich für D-Glucose an XylE (23 % *steady-state* Peakstrom im wt und 19 % Ladungsverschiebung in der OE-Mutante im Vergleich zu D-Xylose).



**Abbildung 29:** Konzentrations-Abhängigkeit der transienten Ströme (links) und dazugehörige KD-Plots der Peakströme (rechts) für *pre steady-state* Reaktionen ausgewählter Substrate und Transporter bei pH 7,6. (a) D-Glucose und D-Xylose induzierte Ströme von D27N XylE. (b) Lactulose- und TDG-induzierte Ströme von E325A LacY. Weitere Parameter der entsprechenden Signale sind in [Tabelle 16](#) gegenübergestellt.

Es ist anzumerken, dass für die Bestimmung der KD-Werte wie auch für die Bestimmung der KM-Werte der Peakstrom verwendet wurde (*Seite 55, Gleichung G32*). Es könnte ebenso die Konzentrations-Abhängigkeit der Ladungen, also der Peak-Integrale untersucht werden. Die Ladung repräsentiert direkt die Menge Substrat-gebundener Transporter nach dem *induced fit*. Da Signale für alle Konzentrationen relativ schnell sind und die Zeitauflösung des Systems limitierend ist (*Abbildung 29, Tabelle 16*), sollte der Peakstrom hauptsächlich eine Konsequenz der veränderten Ladung darstellen. Die Konzentrations-Abhängigkeit der Ladungen ergibt nur geringfügig andere KD-Werte (*Daten nicht gezeigt*) als die diskutierte Konzentrations-Abhängigkeit der Peakströme.

### Ein Vergleich zwischen KD- und KM-Werten

Für LacY und XylE lassen sich die auf Basis der SSM-Messungen ermittelten KM- (*Seite 85, Tabelle 15*) und KD-Werte (*Seite 87, Tabelle 16*) miteinander vergleichen. Dabei liegt die Annahme zugrunde, dass die OE-Mutanten und die wt Transporter dieselben Eigenschaften bezüglich der Zuckerbindung aufweisen. Die KM-Werte werden aus der Konzentrations-Abhängigkeit des *steady-state* Signals der wt Transporter abgeleitet, während die KD-Werte aus der Konzentrations-Abhängigkeit des *pre steady-state* Signals der OE-Mutanten bestimmt werden.

Im *steady-state* ist eine Reaktion nach der *pre steady-state* Reaktion (*induced fit*) ratenlimitierend. Bei Betrachtung der *pre steady-state* Reaktion wird der *induced fit* selbst als ratenlimitierend angenommen, da die Zuckerbindung unter den gegebenen experimentellen Bedingungen signifikant schneller ist (*Seite 76, Abbildung 24*). Dieser Überlegung nach müssten die KD-Werte den tatsächlichen Zuckeraffinitäten entsprechen, die als KS-Werte bezeichnet werden (*Seite 55, Gleichung G34*). Gleichzeitig müssten die KD-Werte größer oder gleich den KM-Werten sein: Durch eine nachfolgende ratenlimitierende Reaktion kann der *steady-state* schon bei niedrigeren Zuckerkonzentrationen gesättigt werden.

Im Falle von LacY sind die KD-Werte größer als die KM-Werte des entsprechenden Substrats. Diese Beobachtung stützt das oben beschriebene Modell, in dem die ratenlimitierende Reaktion im *steady-state* hinter der ratenlimitierenden Reaktion im *pre steady-state* liegt. Interessanterweise stimmt der KD-Wert für D-Lactose mit dem KM-Wert überein, der für den Lactose-Austausch ermittelt wurde (20 mM) [243]. Die Ratenlimitierung, welche den KM-Wert im Symport-Modus gegenüber dem KD-Wert erniedrigt, liegt also im Reaktionszyklus hinter der Zuckerfreisetzung, in Übereinstimmung mit den Annahmen in der Literatur [89, 160]. Hier ist die Protonenfreisetzung oder die Konformationsänderung des leeren Carriers als ratenlimitierend für den Symport beschrieben.

Es ist außerdem anzumerken, dass der Unterschied zwischen KD-Wert und KM-Wert beim Hauptsubstrat am größten (D-Lactose, KM: 5,3 mM, KD: 20 mM; Faktor  $\sim 4$ ) und beim am

langsamsten transportierten Substrat am geringsten (TDG, KM: 0,12 mM, KD: 0,18 mM; Faktor  $\sim 1,5$ ) ist. Für Lactulose liegt der Unterschied bei einem Faktor  $\sim 2$ .

Im Gegensatz zu LacY ergibt sich für Xyle und FucP ein anderes Verhalten. Im neutralen pH-Bereich bei Xyle ist der KD-Wert sowohl in SSM-Messungen als auch in der Literatur (0,4 mM [132] bzw. 1,0 mM an der SSM) geringfügig kleiner als der KM-Wert (0,5 mM [132] bzw. 1,7 mM an der SSM). Für FucP konnte kein KD-Wert auf der SSM ermittelt werden. Im neutralen pH-Bereich ist der KD-Wert aus der Literatur (0,5 mM) [131] jedoch wie bei Xyle niedriger als der KM-Wert aus den SSM-Messungen (0,9 mM auf der SSM). Die Umsatzrate ist in diesen Fällen wahrscheinlich nicht mehr durch die Protonenfreisetzung beeinflusst. Bestätigt wird dies durch die pH-Abhängigkeiten (Seite 102, Abbildung 34). Im neutralen pH-Bereich liegt für FucP und Xyle das pH-Optimum. Es könnte bereits die Protonenbindung ratenlimitierend werden, die vor der elektrogenen *pre steady-state* Reaktion erfolgt.

## Die Stabilität von pH-Gradienten

Biologische Membranen haben sehr hohe Permeabilitätskoeffizienten für Protonen (Seite 10, Gleichung G14), was zu der natürlichen Instabilität von angelegten pH-Gradienten führt. Damit die Abhängigkeit der Transporter-Aktivität vom intraliposomalen pH-Wert gezeigt werden kann, muss dieser im Zuge eines doppelten Lösungswechsels (Seite 47, Abbildung 15b) genau eingestellt werden können. Die Stabilität eines angelegten pH-Gradienten ist von den experimentellen Bedingungen (Lipidzusammensetzung, Pufferzusammensetzung,  $\Delta\text{pH}$ , LPR) abhängig. Um diese zu optimieren, wird vor den elektrophysiologischen Messungen die Stabilität verschiedener pH-Gradienten mit pH- und Potential-sensitiven Farbstoffen untersucht.

## Messungen mit dem pH-sensitiven Farbstoff Pyranin

Die Änderung des pH-Wertes kann indirekt durch die Fluoreszenzänderung des pH-sensitiven Farbstoffs Pyranin beobachtet werden. Pyranin wird während der Liposomen-Präparation oder durch *Freeze-Thaw-Sonicate* Zyklen nachträglich in das Liposom eingebracht und ist aufgrund seines polyanionischen Charakters nicht membrangängig. Nach Abtrennung der extraliposomalen Pyranin-Fraktion dient die Pyranin-Fluoreszenz bei 520 nm als Monitor für den intraliposomalen pH-Wert. Eine genaue Beschreibung der experimentellen Vorgehensweise findet sich auf Seite 65f.

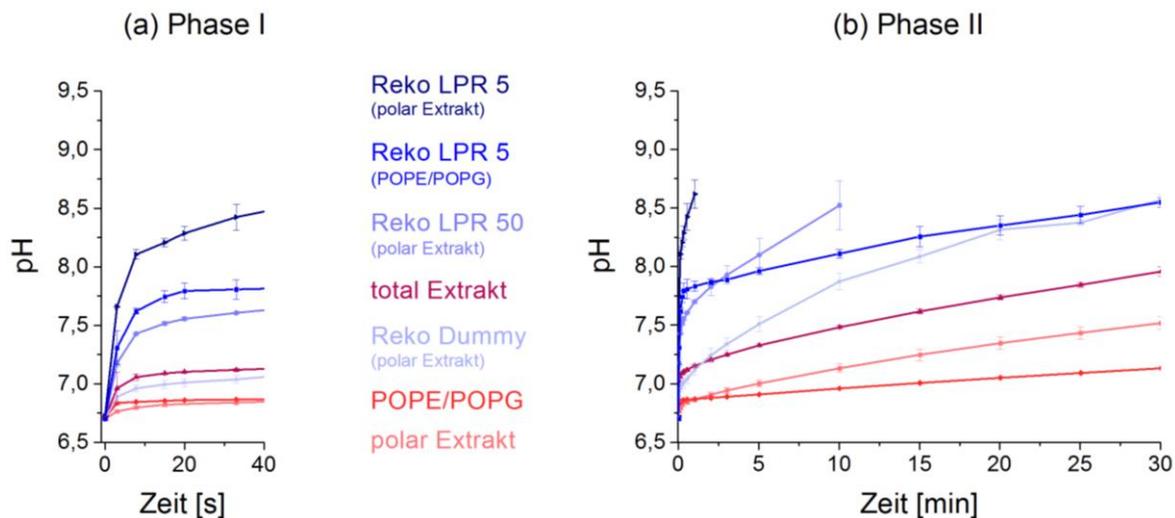
Unmittelbar nach pH-Titration der Liposomen, ergibt sich ein maximaler pH-Gradient, der mit der Zeit abnimmt. Mit der Änderung des inneren pH-Werts verschiebt sich das Anregungsmaximum von Pyranin aufgrund der Deprotonierung von 405 nm auf 460 nm. Die Zeitabhängigkeit von F405/F460 ist direkt proportional zur pH-Änderung (Seite 65, Abbildung 20a). Um Rückschlüsse auf absolute

pH-Änderungen zu ermöglichen, wurde eine Kalibrierkurve aufgenommen, indem F405/F460 für Pyranin-Lösungen mit verschiedenen pH-Werten bestimmt wurde (*Seite 65, Abbildung 20b*). Dies ist notwendig, weil die Pufferzusammensetzung den pK von Pyranin beeinflussen kann [244].

Messungen verschiedener Liposomen und Proteoliposomen am Fluorometer haben ergeben, dass sich der intraliposomale pH-Wert nach Titration biphasisch ändert. Zunächst erfolgt eine schnelle Änderung des inneren pH-Werts ( $\tau < 10$  s), gefolgt von einer langsameren Änderung ( $1 \text{ min} < \tau < \text{h}$ ), deren Geschwindigkeit und Anteile an der gesamten pH-Änderung stark von der Zusammensetzung der Liposomen abhängig ist.

Es wurden verschiedene Lipid-Zusammensetzungen auf die Stabilität angelegter pH-Gradienten getestet (*Abbildung 30*). Ein synthetisches POPE/POPG-Lipid-Gemisch (75 % POPE, 20 % POPG, 5 % CL) und Lipid-Extrakte aus dem Gehirn (Porcine Brain Polar Lipid-Extrakt, Avanti Polar Lipids, *Daten nicht gezeigt*) halten einen pH-Gradienten in der zweiten Phase am längsten aufrecht. Liposomen aus dem *E.coli* Polar Lipid-Extrakt von Avanti zeigen ebenfalls eine hohe Stabilität angelegter pH-Gradienten, wobei der Abbau in der zweiten Phase beschleunigt gegenüber dem synthetischen Lipid-Gemisch ist. Reine Lipid-Gemische zeigen keinen Unterschied in der Größe der ersten Phase, die mit etwa  $\Delta\text{pH} = 0,2$  einen nur sehr kleinen Teil nach pH-Titration mit  $\Delta\text{pH} = 3,0$  ausmacht. Der *E.coli* Total Lipid-Extrakt von Avanti ist in der zweiten Phase vergleichbar mit dem *E.coli* Polar Lipid-Extrakt, während die erste Phase in ihrer Amplitude etwa doppelt so groß ist. Dieser Unterschied lässt sich durch (laut Hersteller) 17,6 % unbekannte Bestandteile im *E.coli* Total Lipid-Extrakt erklären, die möglicherweise Membranproteine darstellen. Der Zusatz von 10 %, 20 % und 30 % Cholesterol zum *E.coli* Total Lipid-Extrakt bewirkt eine sukzessive Vergrößerung der Amplitude in der ersten Phase, aber ein langsames Abklingen in der zweiten Phase (*Daten nicht gezeigt*).

Messungen mit Proteoliposomen bestätigen, dass die Amplitude der ersten Phase der pH-Änderung maßgeblich von Proteinanteilen erhöht wird. Eine LPR von 50 verdoppelt die Amplitude in der ersten Phase im Vergleich zum *E.coli* Total Lipid-Extrakt. Ein Vergleich zwischen LPR 5 Proteoliposomen im synthetischen POPE/POPG-Lipid-Gemisch und LPR 5 Proteoliposomen im *E.coli* Polar Lipid-Extrakt zeigt, dass das synthetische Lipid-Gemisch zwar kaum Einfluss auf die erste Phase nimmt (in beiden Fällen ist  $\Delta\text{pH} = 1$ ), aber einen erheblichen Einfluss auf die Stabilität der zweiten Phase zeigt. Interessanterweise zeigen Liposomen, die genau wie die verwendeten Proteoliposomen mit Detergenzien behandelt wurden, ebenso eine erhebliche Durchlässigkeit für Protonen, jedoch ausschließlich in der zweiten Phase. Damit ist nicht nur der Protein-Anteil, sondern auch Rest-Detergenz für die Undichtigkeit verantwortlich. Zusammenfassend scheint die erste Phase hauptsächlich vom Protein-Anteil beeinflusst, während in der zweiten Phase der Einfluss von Lipid- und Detergenz-Bestandteilen dominiert.



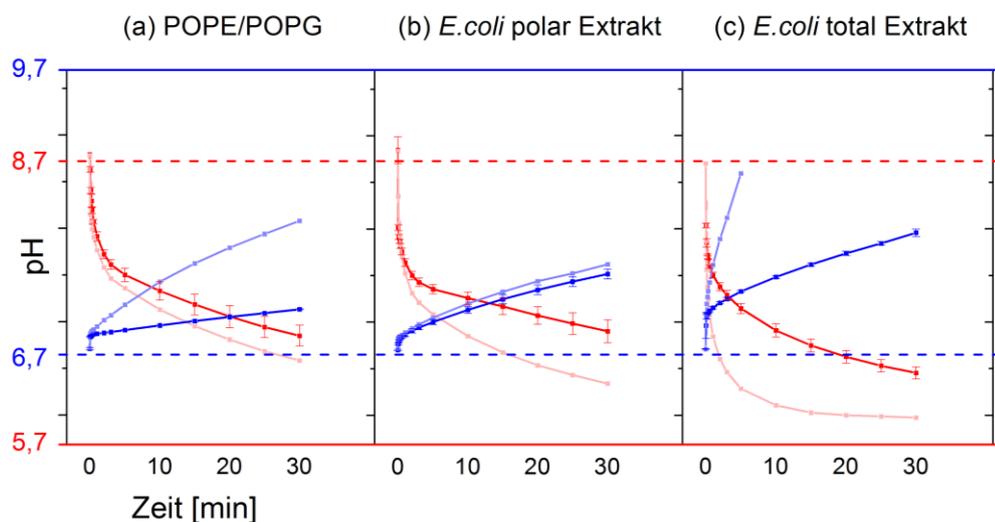
**Abbildung 30:** Änderung des intraliposomalen pH-Wertes nach pH-Titration von pH 6,7 auf pH 9,7 durch Zugabe von KOH für Liposomen und Proteoliposomen unterschiedlicher Zusammensetzung. Es sind eine schnelle Phase (a) und eine langsame Phase (b) zu erkennen, die beide durch ihre Amplitude und Zeitkonstante definiert sind (Seite 97, Tabelle 18). Als reine Lipid-Vesikel wurde ein Gemisch aus 75 % POPE, 20 % POPE und 5 % CL (POPE/POPG) sowie die *E.coli* Lipid-Extrakte von avanti (*polar* und *total*) verwendet. Proteoliposomen wurden mit dem *E.coli* polar Extrakt mit einer LPR von 50 und einer LPR von 5 hergestellt (Reko LPR 5 bzw. LPR 50 (polar Extrakt)). Zu Vergleichszwecken wurde die LPR 5 Probe auch mit dem synthetischen Lipid-Gemisch hergestellt (Reko LPR 5 (POPE/POPG)) und eine reine Lipid-Vesikel-Probe nach einem Rekonstitutionsansatz ohne Protein mit dem polar Lipid-Extrakt (Reko Dummy (polar Extrakt)) verwendet. Details zur experimentellen Vorgehensweise sind auf Seite 65f aufgeführt.

Die Stabilität des pH-Gradienten ist insbesondere von dem pH-Wert vor der Titration abhängig. Als Konsequenz der logarithmischen pH-Skala, entspricht eine pH-Änderung im sauren pH-Bereich einer größeren Änderung in der Protonenkonzentration als dieselbe pH-Änderung im basischen pH-Bereich. So ergibt sich für die Titration von pH 4 zu pH 7 ( $\Delta\text{pH} = 3$ ) die Änderung der Protonenkonzentration zu  $\Delta[\text{H}^+] = 9,99 \times 10^{-5}$ . Für dieselbe pH-Änderung ( $\Delta\text{pH} = 3$ ) von pH 7 zu pH 10 werden mit  $\Delta[\text{H}^+] = 9,99 \times 10^{-8}$  jedoch um drei Größenordnungen weniger Protonen benötigt. Je saurer der Start-pH-Wert, desto mehr Protonen müssen über die Membran fließen, um eine signifikante pH-Änderung zu bewirken. Eine Titration ausgehend von saurem pH-Wert hält den pH-Gradienten daher länger aufrecht als eine Titration ausgehend von basischem pH-Wert. Damit verbunden ergibt sich auch für dieselbe Titration in entgegengesetzte Richtungen eine andere Zeit-Abhängigkeit für den Abbau des pH-Gradienten (siehe unten). Infolge einer Titration von pH 9 auf pH 6 ( $\Delta\text{pH} = 3$ ) fließen während der ersten pH-Änderung von  $\Delta\text{pH} = 1$  genau  $9 \times 10^{-9}$  Protonen. Während der Titration in entgegengesetzter Richtung von pH 6 auf pH 9 ( $\Delta\text{pH} = 3$ ) fließen hingegen während der ersten pH-Änderung von  $\Delta\text{pH} = 1$  mit  $9 \cdot 10^{-7}$  genau hundert mal mehr Protonen. Insgesamt ist  $\Delta\text{pH}$  bei hohen pH-Sprüngen für die Stabilität des pH-Gradienten wesentlich weniger relevant als der absolute pH-Wert der Lösung, die titriert wird.

Die Geschwindigkeit des Protonen-Flusses ist aber auch proportional zur Konzentrationsdifferenz, die wiederum (für  $\Delta\text{pH} > 2$ ) näherungsweise dem sauren pH-Wert entspricht. Für dasselbe  $\Delta\text{pH}$  ist im

sauren pH-Bereich das  $\Delta[H^+]$  und damit der Protonenfluss über die Membran größer (Seite 10, Gleichung G13). Ist der Ausgangs-pH-Wert sauer, so erfolgt damit auch eine schnellere Diffusion der Protonen, allerdings müssen mehr Protonen fließen, um eine signifikante pH-Änderung zu erzielen. Messungen bei verschiedenen pH-Werten haben gezeigt, dass der zweite Effekt überwiegt. Bei sauren pH-Werten erscheint der intraliposomale pH-Wert stabiler (Daten nicht gezeigt). Hinzu kommt der Einfluss des pK-Wertes der Pufferlösung (für KPi ist pK = 6,9): Bei pH-Werten im Bereich  $pK \pm 1$  ändern membranpassierende Protonen den inneren pH-Wert nicht so stark wie bei anderen pH-Werten. Daher sollte besonders bei dem pH-Wert vor der Titration eine hohe Pufferkapazität gewährleistet sein.

In Abbildung 31 ist für Liposomen mit verschiedener Lipid-Zusammensetzung gezeigt welchen Einfluss eine pH-Titration mit demselben  $\Delta pH$ , aber in entgegengesetzte Richtungen, auf die Stabilität des pH-Gradienten hat. Nach einer Titration ins Basische, von pH 6 auf pH 9, ändert sich der intraliposomale pH-Wert unmittelbar nach der Titration wesentlich langsamer als in der umgekehrten Situation, bei einer Titration von pH 9 auf pH 6. Im ersten Fall müssen zu Beginn  $10^3$  mal mehr Protonen fließen, um dieselbe pH-Änderung zu bewirken. Daher ist die pH-Änderung während der ersten Phase signifikant kleiner.



**Abbildung 31: Änderung des intraliposomalen pH-Wertes nach pH-Titration ins Saure und ins Basische für Liposomen unterschiedlicher Zusammensetzung.** Die Titrations erfolgten von pH 8,7 auf pH 5,7 (rote Kurven) durch Zugabe von  $H_3PO_4$  und von pH 6,7 auf pH 9,7 (blaue Kurven) durch Zugabe von KOH. Die roten bzw. blauen horizontalen Linien kennzeichnen den pH-Wert vor der Titration (unterbrochene Linie) und den pH-Wert nach der Titration (durchgängige Linie). In hellrot bzw. hellblau sind die entsprechenden pH-Titrations unter Einfluss von  $5 \mu M$  Valinomycin gezeigt. Valinomycin beeinflusst die Steigung der zweiten Phase. Der pH-Gradient ist in allen Fällen stabiler, wenn die Titration vom Sauren ins Basische erfolgt.

Zur Klärung der Ursache des biphasischen Verhaltens wurden Kontrollen mit Valinomycin und Nigericin durchgeführt. Valinomycin bewirkt als  $K^+$ -Carrier eine Abnahme des Membranpotentials und indirekt eine Verringerung des pH-Gradienten, da das Membranpotential dem Abbau des

pH-Gradienten entgegenwirkt [245]. Nigericin katalysiert den  $K^+/H^+$ -Austausch und reduziert damit den pH-Gradienten direkt [245]. Durch Zugabe von Valinomycin konnte die Steigung der langsamen, zweiten Phase der pH-Änderung erhöht werden (*Abbildung 31, hell-blaue/rote Kurven*). Dies ist ein Indiz dafür, dass die Geschwindigkeit des Protonenflusses in der zweiten Phase durch ein Membranpotential limitiert ist, das sich durch den schnellen Protonenfluss innerhalb der ersten Phase aufgebaut hat. Eine Zugabe von Nigericin bewirkt den direkten Kollaps des pH-Gradienten innerhalb der Zeitauflösung der fluorometrischen Titration ( $< 5$  s), weil Protonen direkt und elektroneutral über die Membran transportiert werden können (*Daten nicht gezeigt*).

### **Messungen mit dem Potential-sensitiven Farbstoff DISC3(5)**

Messungen mit dem Potential-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff DISC3(5) ermöglichen eine nähere Untersuchung des sich infolge einer pH-Titration aufbauenden Membranpotentials. Das Membranpotential beeinflusst den Verteilungskoeffizient von DISC3(5) zwischen Wasser und Membranphase [224, 246]. Zwei damit zusammenhängende Effekte bewirken, dass mit steigendem (innen negativem) Membranpotential die Fluoreszenz bei 660 nm abnimmt: (1) Die Fluorophormoleküle akkumulieren bei innen negativem Potential in der inneren Membranhälfte und unterliegen dem Selbstquenchen und (2) das Emissionsmaximum verschiebt sich von 660 nm im wässrigen Medium auf 690 nm in der Membranphase.

Es werden die gleichen pH-Titrationsen wie in den Pyranin-Experimenten durchgeführt (*Seite 90f*). Statt die Liposomen und Proteoliposomen mit Pyranin zu beladen, wird unmittelbar vor der pH-Titration DISC3(5) zugegeben. Die Fluoreszenzänderung nach pH-Titration ( $dF/F$ ) kann mittels Kalibrierkurve (*Seite 71, Abbildung 22c,d*) auf eine konkrete Potentialänderung  $\Delta\varphi$  zurückgeführt werden. In *Tabelle 17* sind die Amplituden der pH-Änderung in der ersten schnellen Phase des Pyranin-Experiments ( $\Delta pH_1$ , *Seite 92, Abbildung 30*) mit den Ergebnissen der Potential-Messung gegenübergestellt. Nach pH-Titration baut sich für Liposomen verschiedener Lipid-Zusammensetzungen ein Potential in Höhe von -40 mV bis -65 mV auf. In Proteoliposomen ist das sich aufbauende Membranpotential wesentlich höher und kann bis zu -150 mV betragen. Interessant ist die Korrelation zwischen  $\Delta pH_1$  und  $\Delta\varphi$ . Mit steigender Amplitude der ersten, schnellen pH-Änderung  $\Delta pH_1$  steigt auch der Betrag des Membranpotentials  $\Delta\varphi$ . Der zeitliche Verlauf des Potentialaufbaus korreliert zudem mit dem zeitlichen Verlauf der pH-Änderung innerhalb der ersten Phase der Pyranin-Messungen und findet innerhalb der ersten 10 Sekunden nach pH-Titration statt (*Daten nicht gezeigt*). Damit geht die erste Phase der pH-Änderung mit dem Aufbau eines Potentials einher, wobei in der zweiten Phase der pH-Änderung das Potential konstant bleibt. Die Unterschiede bezüglich der Zeit-Abhängigkeit der pH-Änderung zwischen den einzelnen Präparaten (*Seite 92, Abbildung 30*) korrelieren also mit einer Veränderung des Gleichgewichtspotentials.

**Tabelle 17: Vergleich zwischen der Amplitude der ersten, schnellen Phase der pH-Änderung nach pH-Titration im Pyranin-Experiment ( $\Delta\text{pH1}$ ) und den Ergebnissen nach der gleichen pH-Titration im DISC3(5)-Experiment.** Die Werte für  $\Delta\text{pH1}$  wurden aus den Daten in *Abbildung 30 (Seite 92)* durch einen Fit mit *Gleichung G51 (Seite 67)* ermittelt. Die dF/F-Werte entsprechen den normierten DISC3(5)-Fluoreszenzänderungen infolge der pH-Titration (*Seite 71, Abbildung 22c, Inset*). Aus dF/F wird mittels Kalibrierkurve (*Seite 71, Abbildung 22c,d*) das Potential  $\Delta\phi$  und der entsprechende absolute Fehler abgeleitet. Jeder dF/F-Wert entspricht dem Mittelwert aus drei pH-Titrationen von jeweils zwei unabhängig voneinander präparierten Proben (sechs Datenpunkte).

Präparat	$\Delta\text{pH1}$ (aus Pyranin-Messung)	dF/F (aus DISC-Messung)	$\Delta\phi$ [mV] (aus DISC-Kalibrierung)
<i>E.coli</i> polar Extrakt	0,16 ± 0,01	0,13 ± 0,02	- 44 ± 6
POPE/POPG	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,02	- 50 ± 8
<i>E.coli</i> total Extrakt	0,38 ± 0,04	0,18 ± 0,02	- 63 ± 6
LPR 5 Xyle mit POPE/POPG	1,09 ± 0,01	0,12 ± 0,02	- 92 ± 17
LPR 5 Xyle mit polar Extrakt	1,45 ± 0,03	0,36 ± 0,16	- 150 ± 70

Unter der Annahme, dass ausschließlich Protonen und Kalium membrangängig sind, muss sich zwischen den Präparaten nach Goldman (*Seite 8, Gleichung G10*) das Verhältnis von Kalium- und Protonen-Permeabilität ändern. Konkret bedeutet eine Erhöhung des Potentials von - 50 mV auf - 150 mV eine um zwei Größenordnungen relativ zur Kalium-Permeabilität erhöhte Protonen-Permeabilität. Dies entspricht ungefähr dem Unterschied der gemessenen Potentiale für Liposomen und Proteoliposomen nach pH-Titration (*Tabelle 17*). Eine gleichförmige Erhöhung der Permeabilitäten für Protonen und Kalium hätte keinen Einfluss auf das Goldman-Potential. Die Permeabilität für Protonen wird daher sehr wahrscheinlich mehr von der Zusammensetzung der Lipid-Membran beeinflusst als die für Kalium.

### Ein Modell für die biphasische Dissipation von pH-Gradienten

Die beschriebenen Beobachtungen bestätigen publizierte Erklärungsmodelle für die biphasische Dissipation von pH-Gradienten über vesikuläre Membranen [56, 220, 247]. Dabei wird angenommen, dass die erste schnelle Änderung ( $t_{1/2} \sim \text{s}$ ) des intraliposomalen pH-Wertes durch Protonendiffusion entlang des chemischen Gradienten erfolgt. Dabei baut sich ein Potential auf, das dem chemischen Gradienten entgegenwirkt. Die zweite, langsame Änderung ( $t_{1/2} \sim \text{min}$ ) des inneren pH-Wertes ist dann durch die Diffusion anderer Ladungsträger entlang des elektrischen Gradienten limitiert. Bei Verwendung des KPi-Puffers hat die  $\text{K}^+$ -Diffusion wahrscheinlich die größte Relevanz für diesen Prozess, sodass die zweite Phase der pH-Änderung in den durchgeführten Experimenten durch die Geschwindigkeit des Protonen-Kalium-Austauschs limitiert wäre. In der Literatur wurden ähnliche Beobachtungen gemacht, wenn ein Kalium-Gradient angelegt wird: Durch die initiale Kalium-Diffusion wird ein Potential aufgebaut, woraufhin eine pH-Änderung aufgrund des Protonenflusses folgt [248].

Dennoch erklärt dieses Modell nicht alle Beobachtungen. Die zweite Phase der pH-Änderung wird nicht signifikant durch Zugabe von Valinomycin beeinflusst (*Seite 93, Abbildung 31*). Es gibt daher Spekulationen darüber, dass in der zweiten Phase die Protonen in neutraler Form über die Membran gehen, gebunden an ein Anion (in unserem Fall Phosphat). Es konnte bereits gezeigt werden, dass das Anion die Geschwindigkeit der zweiten Phase stark beeinflusst [249]. Zudem gibt es auch Veröffentlichungen, die eine sehr langsame ( $t_{1/2} \sim h$ ), monophasische pH-Änderung beobachten [250–252]. Eine Biphasizität ist daher nicht unter allen experimentellen Bedingungen vorhanden.

### **Ableitung von Permeabilitätskoeffizienten**

Die Geschwindigkeit der pH-Änderung nach pH-Titration während der ersten, schnellen Phase korreliert mit dem Permeabilitätskoeffizienten für Protonen. Die Anfangssteigungen der Kurven in *Abbildung 30 (Seite 92)* und *Abbildung 31 (Seite 93)* dienen als Maß für die Geschwindigkeit der pH-Änderung. Sie werden aus einem Fit mit biexponentieller Funktion abgeleitet (*Seite 67, Gleichungen G51 und G52*). Aus der Anfangssteigung kann dann für jede gegebene Membran-Zusammensetzung der Permeabilitätskoeffizient für Protonen berechnet werden (*Seite 68, Gleichung G56*). Die Ergebnisse sind in *Tabelle 18* dargestellt.

Insgesamt sind die erhaltenen Permeabilitäten für Protonen im Vergleich zu Literaturwerten biologischer und synthetischer Membranen meist um ein bis zwei Größenordnungen höher [253] und entsprechen denen von synthetischen Membranen mit sehr geringer Dicke [51]. Die Protonen-Permeabilitäten in Proteoliposomen sind geringfügig höher als die in reinen Lipid-Vesikeln. Interessanterweise sind die Permeabilitätskoeffizienten für Protonen, die aus pH-Titrationen vom Basischen ins Saure erhalten wurden, immer um ein bis zwei Größenordnungen kleiner, als solche, die aus pH-Titration vom Sauren ins Basische resultieren. Ähnliche Beobachtungen wurden in der Literatur ebenfalls gemacht [221, 222].

Die Geschwindigkeit der zweiten Phase der pH-Änderung könnte vom Permeabilitätskoeffizienten für Kalium oder Phosphat (oder von beiden) beeinflusst werden. Der Permeabilitätskoeffizient für Kalium ist jedoch nicht direkt über den Kaliumfluss während der zweiten Phase zugänglich, da die Triebkraft für die Kalium-Diffusion das Potential und nicht der Konzentrationsgradient darstellt. Er lässt sich aber aus der Goldman-Gleichung ableiten (*Seite 72, Gleichung G57*). Für die Berechnung wurden die ermittelten Permeabilitätskoeffizienten für Protonen auf Basis der pH-Titration von pH 6,7 auf pH 9,7 (*Tabelle 18*) sowie die aus den Messungen mit DISC3(5) bestimmten Membranpotentiale (*Tabelle 17*) verwendet. Die berechneten Permeabilitätskoeffizienten für Kalium liegen zwischen  $10^{-4}$  cm/s für Proteoliposomen und  $10^{-5}$  cm/s für Liposomen und sind demnach um mehrere Größenordnungen höher als die Referenzwerte aus der Literatur, die zwischen  $10^{-9}$  und  $10^{-13}$

cm/s liegen [51, 254]. Die gefundene hohe Permeabilität erklärt auch, warum Valinomycin kaum Einfluss auf die Messungen hatte. So beschleunigte Valinomycin in den Pyranin-Experimenten die zweite Phase der pH-Änderung nur geringfügig (Seite 93, Abbildung 31). Außerdem hatte Valinomycin keinen Effekt auf die DISC3(5)-Fluoreszenz bei angelegtem Kalium-Gradienten (Seite 71, Abbildung 22). Das Gleichgewichts-Potential hat sich hier bereits ohne Valinomycin nach wenigen Sekunden eingestellt.

**Tabelle 18: Gegenüberstellung von Amplituden und Zeitkonstanten für die pH-Änderung im Pyranin-Experiment und daraus berechnete Permeabilitätskoeffizienten für Protonen.** Die Parameter wurden aus biexponentiellen Fits (Seite 67, Gleichungen G51 und G52) der Daten in Abbildung 30 (Seite 92) und Abbildung 31 (Seite 93) erhalten. Die Berechnung der Permeabilitätskoeffizienten ist auf Seite 68 zusammengefasst (Gleichung G56).  $\Delta\text{pH1}$  und  $\Delta\text{pH2}$  sind die Amplituden der ersten schnellen bzw. zweiten langsamen Phase der pH-Änderung infolge der entsprechenden pH-Titration. Für die Fits wurde  $\Delta\text{pH1} + \Delta\text{pH2} = \pm 3$  festgesetzt. Die entsprechenden Zeitkonstanten sind  $\tau_1$  und  $\tau_2$ , sodass die Anfangssteigungen mit  $\Delta\text{pH1}/\tau_1$  und  $\Delta\text{pH2}/\tau_2$  gegeben sind. Die Bezeichnung der Lipid-Proben ist analog zu der in Abbildung 30 (Seite 92).

Lipid	$\Delta\text{pH1}$	$\tau_1$ [s]	$\tau_2$ [min]	$\Delta\text{pH1}/\tau_1$ [s <sup>-1</sup> ]	$\Delta\text{pH2}/\tau_2$ [min <sup>-1</sup> ]	$P_{\text{H}^+}$ [cm/s]
Liposomen      pH 6,7 → pH 9,7						
POPE/POPG	0,15 ± 0,01	1,2 ± 0,6	330 ± 13	0,124	0,009	5,6 · 10 <sup>-2</sup> ± 51%
Polar Extrakt	0,16 ± 0,01	9,1 ± 2,3	109 ± 3	0,017	0,026	7,8 · 10 <sup>-3</sup> ± 31%
Reko Dummy Polar Extrakt	0,38 ± 0,04	9,3 ± 3,4	33 ± 2	0,041	0,079	1,9 · 10 <sup>-2</sup> ± 46%
Total Extrakt	0,38 ± 0,02	2,7 ± 0,6	85 ± 3	0,141	0,031	6,4 · 10 <sup>-2</sup> ± 24%
Liposomen      pH 8,7 → pH 5,7						
POPE/POPG	0,96 ± 0,04	30,9 ± 3,2	49 ± 3	0,031	0,042	8,6 · 10 <sup>-5</sup> ± 14%
Polar Extrakt	1,01 ± 0,05	3,7 ± 1,1	52 ± 7	0,275	0,038	7,6 · 10 <sup>-4</sup> ± 35%
Total Extrakt	1,13 ± 0,05	4,8 ± 1	28 ± 2	0,236	0,067	6,5 · 10 <sup>-4</sup> ± 24%
Proteoliposomen      pH 6,7 → pH 9,7						
Reko LPR 50 (XylE) Polar Extrakt	0,84 ± 0,02	3,9 ± 0,3	16 ± 1	0,214	0,134	9,7 · 10 <sup>-2</sup> ± 10%
Reko LPR 5 (LacY) Polar Extrakt	1,24 ± 0,02	1,4 ± 0,1	4 ± 1	0,88	0,433	4 · 10 <sup>-1</sup> ± 9%
Reko LPR 5 (XylE) Polar Extrakt	1,45 ± 0,03	2,8 ± 0,2	6 ± 1	0,513	0,277	2,3 · 10 <sup>-1</sup> ± 10%
Reko LPR 5 (XylE) POPE/POPG	1,09 ± 0,01	4 ± 0,2	58 ± 1	0,276	0,033	1,3 · 10 <sup>-1</sup> ± 5%

Zwei mögliche Ursachen kommen für diese Beobachtungen infrage: Entweder ist die Kalium-Permeabilität ohne Valinomycin bereits extrem hoch, wie der gefundene Permeabilitätskoeffizient für Kalium andeutet. Oder die zweite Phase der pH-Änderung kommt durch den Transport anderer Ionen mit extrem hoher Permeabilität zustande. Denkbar ist eine elektroneutrale Diffusion eines Protons mit einem Phosphat-Anion, sodass der gefundene Permeabilitätskoeffizient dem von Phosphat entsprechen könnte. Es ist wahrscheinlich, dass die zweite Phase der pH-Änderung durch die Diffusion mehrerer Puffer-Komponenten limitiert ist. So könnte der Einfluss unterschiedlicher Puffersysteme auf die zweite Phase der pH-Änderung untersucht werden, um Klarheit zu schaffen.

Ähnliche Experimente zur Untersuchung der Stabilität von pH-Gradienten mit Pyranin wurden an einer *stopped flow*-Apparatur durchgeführt, indem 100 µl Liposomen Suspension mit 900 µl Puffer eines anderen pH-Wertes gemischt wurden (*Daten nicht gezeigt*). Die Phasen der pH-Änderungen haben sich signifikant von denen unterschieden, die am Fluorometer ermittelt wurden. Insbesondere war die Anfangssteigung der pH-Änderung an der *stopped flow* signifikant niedriger als am Fluorometer und es ließen sich mehr als zwei Phasen auflösen. Auch die Mischtechnik hat somit einen großen Einfluss auf die Geschwindigkeit der intraliposomalen pH-Änderung und könnte daher die berechneten Permeabilitätskoeffizienten beeinflussen.

### **Konsequenzen für pH-abhängige Messungen an der SSM**

Die auf den vorangehenden Seiten dargestellten Erkenntnisse zeigen zwei wesentliche Konsequenzen für die Messungen von pH-Abhängigkeiten mit der SSM. Der intraliposomale pH-Wert hat sich bereits nach wenigen Sekunden zu einem signifikanten Teil an den äußeren pH-Wert angeglichen. Die Konsequenz ist, dass der pH-Wert der Ruhelösungen im SSM Experiment mit pH-Gradienten nicht exakt dem intraliposomalen pH-Wert entspricht (*Seite 47, Abbildung 15b*). Gleichzeitig baut sich innerhalb weniger Sekunden ein Membranpotential auf, sodass alle Peakströme nicht nur die Abhängigkeit vom inneren pH-Wert sondern unter Umständen auch die vom Potential repräsentieren. Es sind daher Kontrollen notwendig, um einen Einfluss des Potentials auf die Transporter-Aktivität auszuschließen.

### **pH-Abhängigkeit der *E.coli* Transporter bei symmetrischen pH-Werten**

Das Proton ist neben dem Zucker das zweite Substrat, das in LacY, FucP und XylE für den PMF-gekoppelten Symport benötigt wird. Im Gegensatz zu den Messungen mit verschiedenen Zucker-Konzentrationen (*Seite 81, Abbildung 26*), die immer nur extraliposomal eingestellt werden können, existieren bei der Messung von pH-Abhängigkeiten immer endliche Protonen-Konzentrationen auf beiden Seiten der Membran. Die pH-Abhängigkeit der Transportaktivität erlaubt daher Rückschlüsse über die apparente Protonen-Affinität bzw. die pK-Werte auf beiden Seiten der Membran sowie die Position der pH-Optima der verschiedenen Transporter. Messungen mit D<sub>2</sub>O statt H<sub>2</sub>O ermöglichen darüber hinaus Rückschlüsse, ob Protonenbindung oder -freisetzung die Umsatzrate beeinflussen. Zudem kann anhand der Zucker-induzierten *pre steady-state* Reaktion in wt Transporter bei extrem hohen pH-Werten überprüft werden, ob der Zucker auch an den unprotonierten Carrier bindet. Die pH-Abhängigkeit der Ladungsverschiebung in den OE-Mutanten hilft dabei den Ursprung des *pre steady-state* Signals besser zu verstehen.

## Isotopeneffekte: Messungen in D<sub>2</sub>O

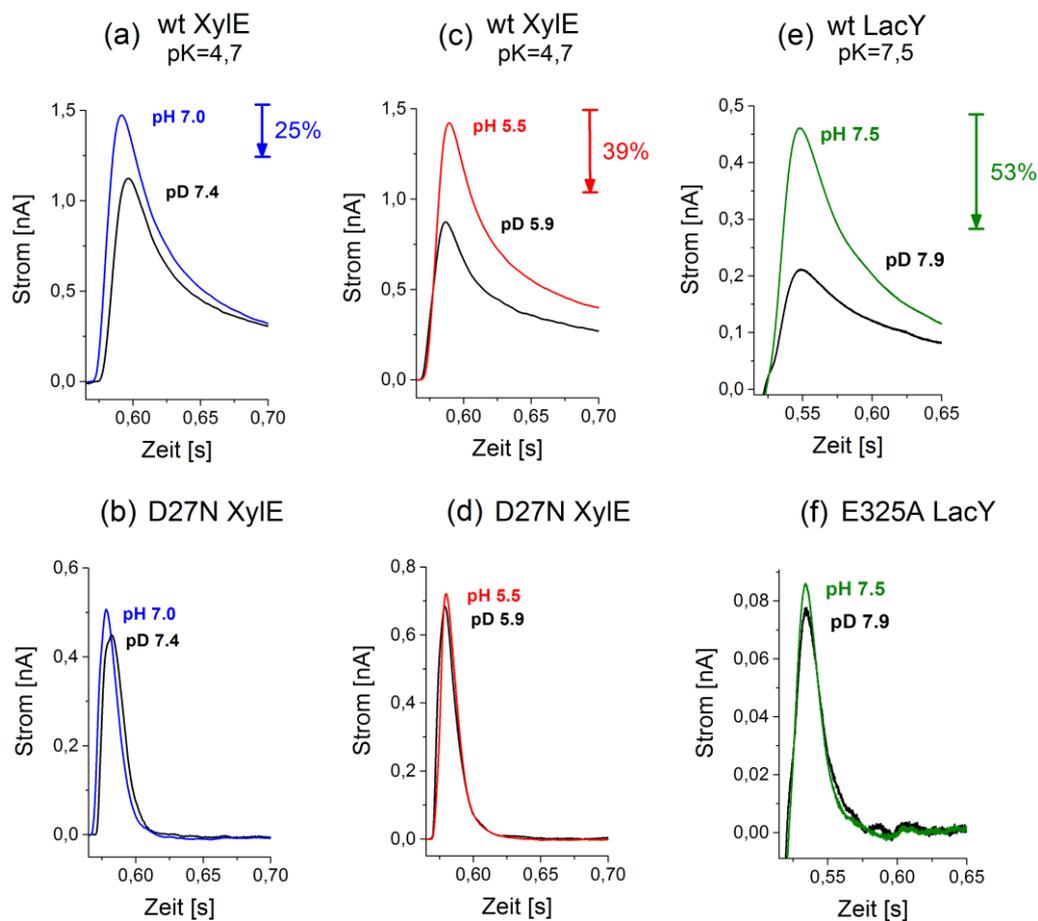
Wird das Edukt einer chemischen Reaktion durch ein schwereres Isotop ersetzt, ist die Ratenkonstante dieser Reaktion oft verringert [255, 256]. Diese Gesetzmäßigkeit ist als kinetischer Isotopeneffekt bekannt und kann ausgenutzt werden, um den ratenlimitierenden Schritt einer Reaktionsfolge zu identifizieren. So würden im Transportzyklus von LacY, FucP und XylE die Protonenbindung und -freisetzung in D<sub>2</sub>O-haltiger Lösung sehr wahrscheinlich langsamer ablaufen als in H<sub>2</sub>O. Ist die entsprechende Reaktion ratenlimitierend, führt dies zu einer Verringerung der Umsatzrate und damit auch des *steady-state* Peakstroms.

Neben dem Effekt auf die Kinetik, also der Verringerung der Ratenkonstante der Reaktion, resultiert in D<sub>2</sub>O auch eine pK-Verschiebung von  $pK_D - pK_H = 0,6$ , also ein Einfluss auf das Bindungsgleichgewicht [255]. Diese pK-Verschiebung ist anhand der pH-Abhängigkeit der Umsatzrate auch dann zu beobachten, wenn nicht die Protonenfreisetzung selbst, sondern die nachfolgende Konformationsänderung des leeren Carriers ratenlimitierend ist. Bei pH-Werten in der Nähe des pK-Wertes ist die Konzentration des unprotonierten, einwärtsgerichteten Carriers ( $P_{in}$ ), also das Edukt für die Konformationsänderung des leeren Carriers, stark reduziert. Damit wird die ratenlimitierende Konformationsänderung des leeren Carriers und somit die Umsatzrate im Bereich des pK-Wertes verlangsamt. Eine pK-Verschiebung in D<sub>2</sub>O würde also auch detektiert werden, wenn die Konformationsänderung des leeren Carriers ratenlimitierend ist. Ein Einfluss auf die Umsatzrate am pH- bzw. pD-Optimum ergibt sich jedoch nicht, da die Ratenkonstante der Konformationsänderung nicht durch D<sub>2</sub>O beeinflusst wird. Nur wenn die Protonenfreisetzung selbst die ratenlimitierende Reaktion darstellt, steigt in D<sub>2</sub>O nicht nur der pK-Wert, sondern nimmt auch die Umsatzrate am pH-Optimum ab.

Für wt LacY und wt XylE wurden Substratsprünge bei sättigenden Konzentrationen in D<sub>2</sub>O- und H<sub>2</sub>O-haltiger Lösung durchgeführt und die resultierenden *steady-state* Peakströme verglichen (Abbildung 32). Bei pH-Werten in der Nähe des pKa-Wertes des jeweiligen Transporters (Seite 103, Tabelle 19) resultiert in D<sub>2</sub>O-haltiger Lösung die größte Reduktion des Peakstroms. So ergibt sich für LacY (pKa = 7,5) bei pH 7,5 eine Abnahme des Peakstroms um 53 % (Abbildung 32e). Die Änderung der Transportrate wird kleiner, je größer der Abstand zwischen pH- und pK-Wert des Transporters ausfällt: Für XylE (pKa = 4,7) ergibt sich bei pH 7,0 nur noch eine Reduktion des Peakstroms um 25 % (Abbildung 32a).

In der Literatur wurde die Verschiebung des pH-Profiles der LacY-Efflux-Aktivität in D<sub>2</sub>O-haltiger Lösung gemäß dem oben beschriebenen kinetischen Isotopeneffekt interpretiert und damit die Protonenfreisetzung als ratenlimitierende Reaktion identifiziert [89]. Das pH-Profil ist zu basischen

pH-Werten hin verschoben, wobei die Umsatzrate am pH- bzw. pD-Optimum identisch sind [89]. Letzteres deutet jedoch darauf hin, dass die Protonenfreisetzung selbst nicht ratenlimitierend ist, da dies auch die Umsatzrate am pH-Optimum reduzieren würde. Der Einfluss von D<sub>2</sub>O beschränkt sich auf eine pK-Verschiebung, sodass sehr wahrscheinlich die nachfolgende Konformationsänderung des leeren Carriers ratenlimitierend ist und die Protonenfreisetzung nur über das vorgelagerte Gleichgewicht die Umsatzrate beeinflusst. Dieser Überlegung liegt die Annahme zugrunde, dass über den gesamten pH-Bereich bis zum pH-Optimum entweder die Protonenfreisetzung oder die Konformationsänderung des leeren Carriers ratenlimitierend ist und keine dritte pH-unabhängige Reaktion ratenlimitierend wird.



**Abbildung 32: Einfluss von D<sub>2</sub>O auf die transienten Ströme der wt Transporter XyleE und LacY sowie der OE-Mutanten.** Die Messungen erfolgten mit den jeweiligen Hauptsubstraten D-Lactose und D-Xylose bei sättigender Konzentration. Die pH-Werte wurden mit unterschiedlich großen Abweichungen vom pK<sub>a</sub>-Wert für die Protonenfreisetzung des jeweiligen Transporters gewählt (Seite 103, Tabelle 19). Der angegebene pD entspricht pH + 0,4 [257]. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Reduktion des Peakstroms bei Wechsel von H<sub>2</sub>O- zu D<sub>2</sub>O-haltiger Lösung.

Es konnte gezeigt werden, dass D<sub>2</sub>O nicht nur die Umsatzrate bei gegebenem pH-Wert reduziert, sondern auch einen Effekt auf die Geschwindigkeit der Zuckerbindung hat [176]. Dies impliziert eine interne Protonentransfer-Reaktion, welche die Geschwindigkeit der Zuckerbindung limitiert. Gleichzeitig ist dies ein Hinweis darauf, dass sich der primäre Protonenakzeptor von der

Protonenbindestelle unterscheiden könnte. Ein Vorschlag für einen primären Protonenakzeptor in LacY war His322, der das Proton dann infolge der Zuckerbindung auf E325 transferiert [173]. Dieser Effekt ist jedoch nicht für das *pre steady-state* Signal der OE-Mutanten von LacY und XylE auf der SSM sichtbar (Abbildung 32b,d,f). Im Gegensatz zu den *steady-state* Signalen der wt Transporter zeigt das *pre steady-state* Signal der Mutanten keine signifikante Änderung in D<sub>2</sub>O-haltiger Lösung. Da es sich um grundsätzlich unterschiedliche Experimente handelt, ist es durchaus möglich, dass verschiedene Teilreaktionen beobachtet werden. Ein möglicher interner Protonentransfer wäre demnach zwar ratenlimitierend für die schnelle Zuckerbindung, aber nicht für die elektrogene *pre steady-state* Reaktion.

### pH-Abhängigkeit des *steady-states* und Titrationsmodell

Alle Transporter zeigen eine strikte Abhängigkeit des *steady-state* Symports vom pH-Wert mit charakteristischen Unterschieden. Sie haben im sauren und basischen pH-Bereich eine niedrige Aktivität, während nahe dem physiologischen pH-Bereich ein sehr breites pH-Optimum zu beobachten ist. Sowohl die Inhibition im Sauren als auch die im Basischen folgt einer Titrationskurve. Durch das breite pH-Optimum ist ein Fit mit zwei Titrationsgleichungen unter Berücksichtigung symmetrischer pK-Werte nicht möglich (Abbildung 33). Es ergeben sich demnach mindestens zwei pK-Werte für jeden Transporter.

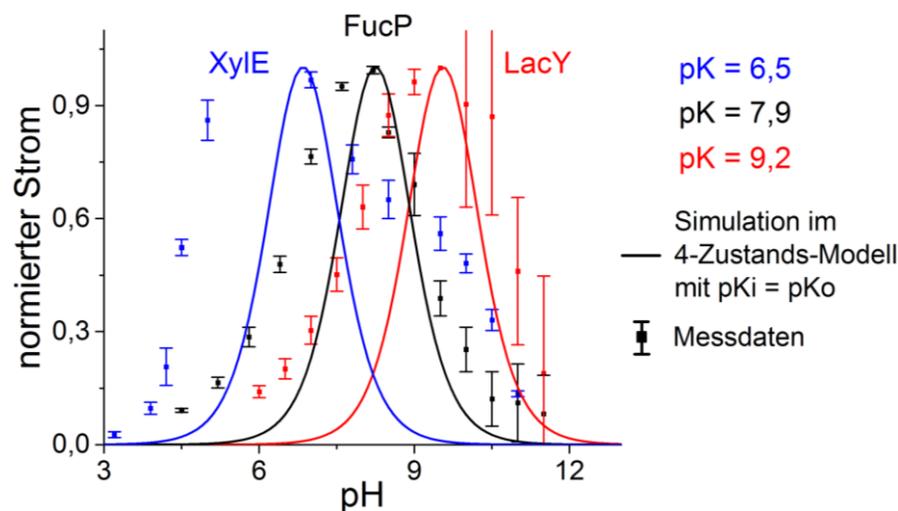
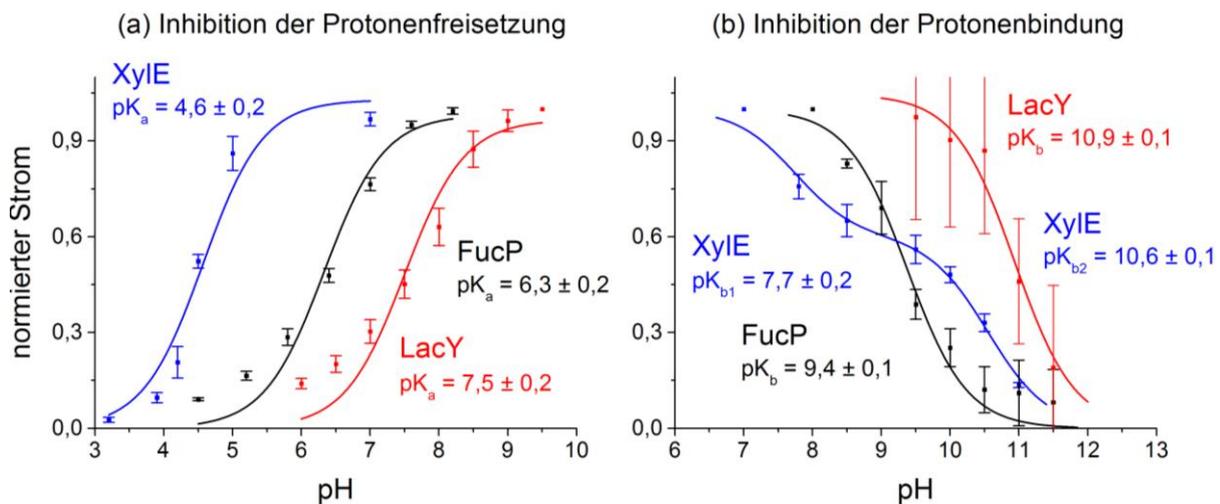


Abbildung 33: Vergleich der pH-Abhängigkeit experimentell ermittelter Peakströme und im 4-Zustands-Modell unter Annahme symmetrischer pK-Werte simulierter Umsatzraten. Die experimentell ermittelten Peakströme entsprechen denen aus Abbildung 34. Die Umsatzrate  $U(\text{pH})$  im 4-Zustands-Modell (Seite 64, Abbildung 19) wurde mit Gleichung G50 berechnet und auf den Wert am pH-Optimum normiert.

### Das pH-Profil aller E.coli Transporter zeigt mindestens zwei pK-Werte

Das pH-Profil repräsentiert eine Glockenkurve mit einem relativ breiten Aktivitätsplateau im neutralen bis leicht basischen pH-Bereich. Durch einen Fit der Daten mit zwei Titrationsfunktionen

(Seite 56, Gleichungen G41 bis G45) können für jeden Transporter zwei pK-Werte abgeleitet werden (Abbildung 34, Tabelle 19). Der basische pK-Wert (pK<sub>b</sub>) wird der Protonenbindung in der auswärtsgerichteten Konformation und der saure pK-Wert (pK<sub>a</sub>) der Protonenfreisetzung in der einwärtsgerichteten Konformation zugeordnet. Das pH-Profil ergibt sich dadurch, dass im sauren pH-Bereich aufgrund von Protonenüberschuss die Protonenfreisetzung die Umsatzrate beeinflusst, während im basischen pH-Bereich aufgrund von Protonenmangel die Protonenbindung die Umsatzrate limitiert. Dass die Protonenfreisetzung über das vorgelagerte Gleichgewicht die Umsatzrate beeinflusst, konnte bereits durch Messungen mit D<sub>2</sub>O gezeigt werden (Seite 100, Abbildung 32).



**Abbildung 34: pH-Abhängigkeit der Peakströme für den Transport von D-Lactose, L-Fucose und D-Xylose in LacY, FucP und Xyle.** Dargestellt sind die auf das pH-Optimum normierten Peakströme mit der Ausnahme von Xyle im sauren pH-Bereich; hier wurden die rekonstruierten Transporter-Ströme verwendet (Seite 105, Abbildung 35). Es erfolgten separate Fits mit unterschiedlichen pK-Werten für die Inhibition des Transports im Sauren (a) und im Basischen (b) auf Basis der entsprechenden Titrationsgleichung (Seite 57, Gleichungen G40 bis G42). Aus den Fits wurden die angegebenen apparenten pK<sub>a</sub>- und pK<sub>b</sub>-Werte abgeleitet. Für die Inhibition im Basischen in wt Xyle mussten zwei pK<sub>b</sub>-Werte angenommen werden (Gleichung G42). Entsprechende exemplarische transiente Ströme zu diesen Datensätzen sind in Abbildung 36 dargestellt. Die ermittelten pK-Werte sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Interessanterweise sind die für die drei Transporter ermittelten pH-Profile im sauren pH-Bereich um drei pH-Einheiten verschoben (Abbildung 34a, Tabelle 19). Xyle ist mit einem pK<sub>a</sub> von 4,6 noch bei sauren pH-Werten aktiv, während FucP und LacY pK<sub>a</sub>-Werte von 6,3 und 7,5 aufweisen und damit bei sauren pH-Werten niedrigere Aktivitäten aufweisen. Der für LacY ermittelte pK<sub>a</sub>-Wert stimmt gut mit dem in Transportassays für den Efflux-Modus gefundenen pK<sub>a</sub>-Wert von 8,5 überein [89]. Die physiologische Relevanz der unterschiedlichen pK<sub>a</sub>-Werte ist unklar, zumal alle drei Transporter im selben Organismus vorkommen und denselben äußeren Bedingungen unterliegen. Zudem ist der zytoplasmatische pH-Wert gut reguliert und bei pH 7,6 konstant. Eine Verringerung des pK<sub>a</sub>-Wertes weit unterhalb von pH 7,6 hat also keinen offensichtlichen Vorteil für die Kinetik des Transporters.

Dies könnte ein Hinweis sein, dass der pKa-Wert eine Konsequenz aus dem Transportmechanismus ist und nicht durch die äußeren Umweltbedingungen diktiert wird.

Die Inhibition des Transports durch Protonenmangel im basischen ist teilweise komplexer (*Abbildung 34b, Tabelle 19*). FucP und LacY zeigen eine klassische Titrationskurve mit pKb-Werten von 9,4 und 10,9. Der pKb-Wert für LacY stimmt mit den pK-Werten überein, die in der Literatur für die Zuckerbindung ermittelt wurden [164, 176, 177]. Im Falle von XylE wird die Inhibition im Basischen pH-Bereich durch zwei Titrationskurven mit pK-Werten von 7,7 und 10,6 beschrieben. Die pH-Abhängigkeit der KM-Werte zeigte jedoch, dass der pK-Wert von 10,6 der pK-Wert der Protonenbindestelle sein muss (*Seite 83, Abbildung 27*). Der pK-Wert von 7,7 muss daher einem weiteren regulatorischen, protonierbaren Rest in XylE zugeordnet werden, der zwar die Transportrate aber nicht die Zuckerbindung beeinflusst. Damit liegen für alle *E.coli* Transporter die pKb-Werte mit  $\geq 9,5$  signifikant über den pKa-Werten. Auch die extrem hohen pKb-Werte für die *E.coli* Transporter machen ähnlich wie die niedrigen pKa-Werte physiologisch betrachtet wenig Sinn: Die natürliche Umgebung von *E.coli* ist der Darm, wo pH-Werte zwischen pH 5 und pH 7,5 schwanken [174, 175]. Zudem ist *E.coli* nur bis pH 9,8 überlebensfähig [258]. Es ist nicht ersichtlich welchen physiologischen Vorteil pK-Werte von 10,6 (XylE) oder 10,9 (LacY) für die Kinetik des Transports haben sollen. In *Abbildung 41 (Seite 118)* wurde für GlcP ein pKb-Wert von 8,6 direkt aus dem Zuckerbindungs-induzierten *pre steady-state* Signal bestimmt. Der pKb-Wert liegt erwartungsgemäß unterhalb der pKb-Werte der *E.coli* Transporter, weil *Staphylococcus epidermidis* in eher sauren Umgebungen mit pH-Werten im Bereich von 5,5 vorkommt [259].

**Tabelle 19: Übersicht der apparenten pKa- und pKb-Werte.** Die pK-Werte wurden aus den Datensätzen in *Abbildung 34* durch Fits mit den entsprechenden Titrationsgleichungen (*Seite 57, Gleichungen G40 bis G42*) bestimmt. \* Der niedrigere pKb-Wert für XylE ist einer zweiten regulatorischen Protonenbindestelle zuzuordnen (*Seite 83, Abbildung 27*). \*\* Der pKb-Wert für GlcP wurde aus der pH-Abhängigkeit eines *pre steady-state* Signals bestimmt (*Seite 118, Abbildung 41*).

Transporter	Protonenbindestelle	pKa-Wert (H <sup>+</sup> Freisetzung)	pKb-Wert (H <sup>+</sup> Bindung)	
LacY	E325	7,5 ± 0,2	10,9 ± 0,1	
FucP	D46	6,3 ± 0,2	9,4 ± 0,1	
XylE	D27	4,6 ± 0,2	7,7 ± 0,2*	10,6 ± 0,1
GlcP	D22	/	8,6 ± 0,2**	

**pH-Profile haben breite Aktivitätsplateaus: Überlegungen zur Ratenlimitierung**

Insgesamt ergeben sich für alle Transporter breite Aktivitätsplateaus ( $pKa < pH < pKb$ ) von etwa drei bis sechs pH-Einheiten (*Abbildung 34*). Auf diesen Plateaus wird die Umsatzrate nicht mehr signifikant von der Protonenbindung oder -freisetzung beeinflusst. Eine andere, in diesem pH-Bereich pH-unabhängige Teilreaktion im Transportzyklus muss die Umsatzrate am pH-Optimum bestimmen.

Dies bestätigen auch Messungen mit pH-Gradienten (*Daten nicht gezeigt*): Wenn weder die Protonenbindung (außen saurer  $\text{pH} < \text{pK}_b$ ), noch die Protonenfreisetzung (innen basischer  $\text{pH} > \text{pK}_a$ ) ratenlimitierend ist, aber der Transport nicht weiter über die Umsatzrate am pH-Optimum unter symmetrischen pH-Bedingungen beschleunigt werden kann, muss ein anderer Schritt im Reaktionszyklus die Umsatzrate limitieren.

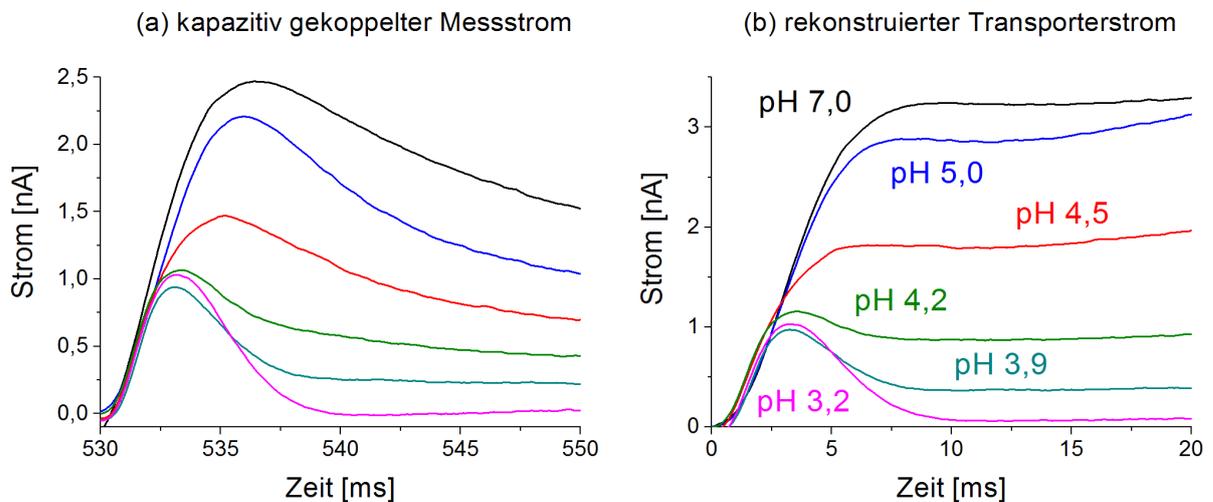
Auf *Seite 85 (Tabelle 15)* wurde gezeigt, dass die Ratenlimitierung bei pH 7,6 für die meisten Substrate durch die Konformationsänderung des beladenen Carriers bestimmt wird. Eine Ausnahme war der Transport von D-Lactose durch LacY. Die pH-Profile liefern hier eine Erklärung: Im Gegensatz zu FucP und XylE hat LacY bei pH 7,6 noch nicht das pH-Optimum erreicht, sodass hier das vorgelagerte Gleichgewicht der Protonenfreisetzung die Umsatzrate limitiert. Möglicherweise ist im Bereich des pH-Optimums auch für den Transport von D-Lactose durch LacY die Konformationsänderung des beladenen Carriers ratenlimitierend. Die Messungen mit  $\text{D}_2\text{O}$  hingegen zeigen, dass der  $\text{pK}_a$ -Wert über das vorgelagerte Gleichgewicht der Protonenfreisetzung die effektive Rate der Konformationsänderung des leeren Carriers bestimmt und dadurch die Umsatzrate limitiert (*Seite 100, Abbildung 32*). So könnte am pH-Optimum prinzipiell auch die Konformationsänderung des leeren Carriers ratenlimitierend sein, weil sie ihre maximale effektive Rate erreicht hat (der einwärtsgerichtete Transporter liegt für  $\text{pH} > \text{pK}_a$  vollständig im unprotonierten Zustand vor).

Es ist anzumerken, dass in der Literatur für LacY im Zucker-getriebenen Symport-Modus die Protonenfreisetzung als ratenlimitierende Reaktion identifiziert wurde [89]. Die vorliegenden Messungen zeigen jedoch, dass auch die Protonenbindung ratenlimitierend werden kann, wenn der pH-Wert oberhalb des breiten pH-Optimums des jeweiligen Transporters liegt. Da für LacY das pH-Optimum im Vergleich zu den übrigen Transportern weit zum basischen pH-Bereich verschoben ist, ist die Protonenfreisetzung hier fast über den gesamten pH-Bereich ratenlimitierend im Zucker-getriebenen Symport; im Vergleich zu FucP und XylE ist LacY in diesem Zusammenhang demnach die Ausnahme.

### ***Transiente Ströme und pre steady-state Komponenten***

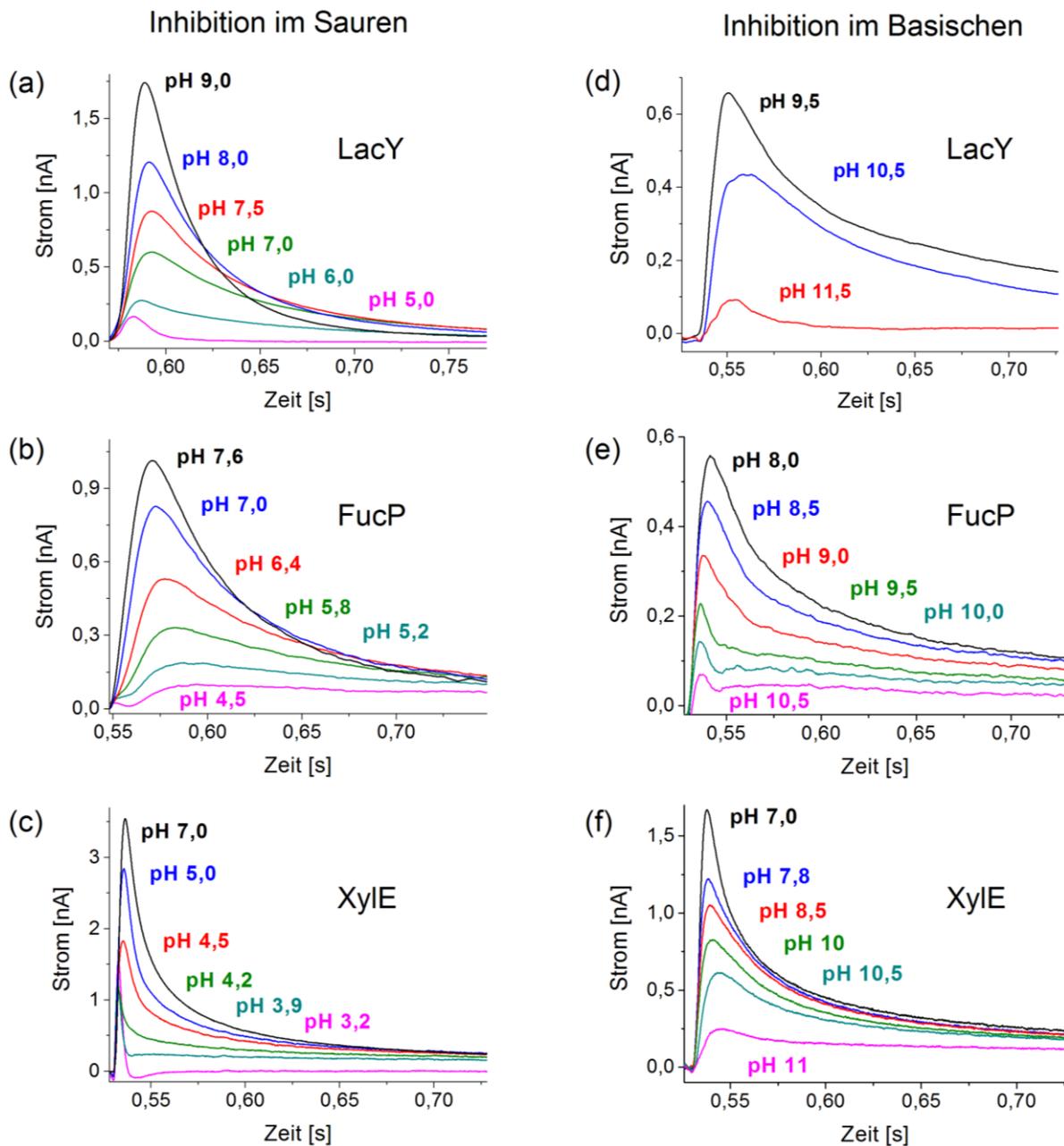
Eine Schwierigkeit bei der Ableitung der  $\text{pK}$ -Werte bei XylE und LacY sind die *pre steady-state* Signale, welche durch die *steady-state* Komponenten überdeckt sind, aber die Peakströme abhängig vom pH-Wert mit beeinflussen könnten. Die *pre steady-state* Komponenten werden sichtbar, wenn der *steady-state* inhibiert ist, so beispielsweise bei stark sauren pH-Werten für LacY und XylE (*Seite 75, Abbildung 23*). Dieses Problem wurde für LacY und XylE unterschiedlich gelöst: Im Falle von LacY ist die *pre steady-state* Komponente relativ klein und dominiert erst bei pH-Werten  $< 6,0$ , also unterhalb des  $\text{pK}_a$ -Wertes. Daher wurden für den Fit mit der Titrationsgleichung nur Peakströme bei pH-Werten  $> 6,0$  herangezogen. Im Falle von XylE sind die *pre steady-state* Ströme größer. In diesem

Fall wurden die Transporter-Ströme aus den transienten Strömen rekonstruiert und die sich ergebenden stationären Ströme statt der Peakströme für den Fit verwendet ([Abbildung 35](#)).



**Abbildung 35: pH-Abhängigkeit des kapazitiv gekoppelten Messstroms und des rekonstruierten Transporterstroms für den Transport von D-Xylose in wt XylE.** (a) Die kapazitiv gekoppelten Messströme entsprechen denen in [Abbildung 36c](#). (b) Rekonstruktion der Transportströme aus (a). Hier bleibt der *pre steady-state* Strom nahezu unverändert, während der stationäre Transporterstrom für große Zeiten  $t$  abgelesen werden kann. Der stationäre Transporterstrom bei  $t = 20$  ms wird für den Fit in [Abbildung 34a](#) verwendet.

In [Abbildung 36](#) sind die pH-Abhängigkeiten exemplarischer transienter Ströme dargestellt, aus denen auch die Peakströme zur Bestimmung der  $pK$ -Werte abgelesen wurden ([Abbildung 34, Tabelle 19](#)). Die transienten Ströme können darüber hinaus zusätzliche Informationen über den Transportmechanismus enthalten. Es ist zu erkennen, dass die Abklingzeit  $\tau_2$  größer wird, je kleiner der Peakstrom ist. So ergibt sich im stark basischen und sauren pH-Bereich ein größeres  $\tau_2$ . Dies lässt sich durch das langsamere Aufladen des Membrankondensators bzw. den langsameren Anstieg des Membranpotentials bei geringerer Umsatzrate erklären. Eine ausführliche Erklärung des Zusammenhangs findet sich auf [Seite 34f](#). Interessant ist auch, dass die Signale der Transporter mit niedrigeren Peakströmen auch größere Abklingzeiten aufweisen. So zeigt XylE die größten Peakströme und die niedrigsten Abklingzeiten, während FucP die niedrigsten Peakströme und die höchsten Abklingzeiten zeigt. In FucP sinkt darüber hinaus die Anstiegszeit  $\tau_1$  mit dem pH-Wert. Im Sauren erfolgt eine Verlangsamung der Protonenfreisetzung, was die Zeit bis zum Erreichen des *steady-states* erhöht. Diese Beobachtung wird nur für FucP gemacht, weil im Gegensatz zu LacY und XylE kein schnelles *pre steady-state* Signal im Sauren zum Anstieg des transienten Stroms beiträgt.



**Abbildung 36: pH-Abhängigkeit der transienten Ströme für den Transport von D-Lactose, L-Fucose und D-Xylose in LacY, FucP und XylE.** Die transienten Ströme für FucP im Sauren und LacY im Sauren und Basischen wurden mit dem langsamen Setup, die von FucP im Basischen und von XylE im Sauren und Basischen wurden mit dem schnellen Setup aufgenommen. Die entsprechende pH-Abhängigkeit der Peakströme ist in [Abbildung 34](#) dargestellt. Die Ströme im sauren und basischen pH-Bereich wurden an unterschiedlichen Sensoren gemessen, was die Unterschiede in den Amplituden erklärt.

### pH-Abhängigkeit der *pre steady-state* Reaktion: OE-Mutanten und wt im Vergleich

Die pH-Abhängigkeit der *pre steady-state* Reaktion ist in den wt Transportern nicht direkt zugänglich, da für die meisten pH-Werte die Elektrogenität des *steady-state* dominiert. In den OE-Mutanten ist die Protonenbindestelle nicht vorhanden, sodass kein *steady-state* Symport stattfinden kann. Dies ermöglicht die direkte Untersuchung der pH-Abhängigkeit der *pre steady-state* Signale und den Vergleich mit den *pre steady-state* Signalen der wt Transporter bei extremen pH-Bedingungen, wenn der *steady-state* inhibiert ist.

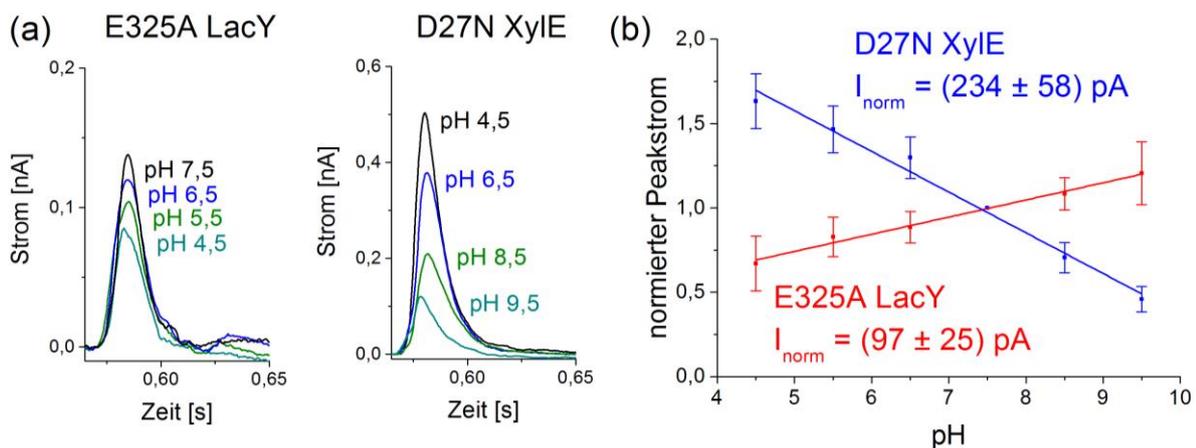
Die aus den schnellen Ladungsverschiebungen abgeleiteten Ratenkonstanten aller Zucker-Transporter sind relativ ähnlich und jeweils identisch für OE-Mutante und wt Transporter (*Tabelle 20*). Die transienten Ströme der OE-Mutanten aller drei *E.coli* Transporter sind bei allen gemessenen pH-Werten symmetrisch (*Abbildung 37a*), sodass die Zeitauflösung des Setups für die Bestimmung der Ratenkonstanten limitierend ist. Die abgeleiteten Ratenkonstanten (etwa  $300 \text{ s}^{-1}$ ) sind daher als untere Grenzen zu betrachten, wie bereits bei den Substrat-Abhängigkeiten der *pre steady-state* Reaktionen erläutert (*Seite 87, Tabelle 16*). Eine Ausnahme bildet GlcP. Hier können die Ratenkonstanten der *pre steady-state* Reaktionen mit  $90 \text{ s}^{-1}$  ( $\text{pH} < \text{pKb}$ ) bzw.  $220 \text{ s}^{-1}$  ( $\text{pH} > \text{pKb}$ ) aufgelöst werden.

Im Gegensatz zur Ratenkonstante der *pre steady-state* Reaktion unterscheiden sich die absoluten Ladungsverschiebungen erheblich voneinander. Sie nehmen meist positive Werte an, aber können von 0,5 pC bis zu 12 pC reichen. Meist liegen die Ladungsverschiebungen in wt und OE-Mutante bei identischem pH-Wert in derselben Größenordnung, was darauf hinweist, dass in wt und OE-Mutante derselbe Prozess beobachtet wird. Für LacY wurde abgeschätzt, dass die beobachtete Ladungsverschiebung etwa 6 % einer Elementarladung ausmacht [205]. Die unterschiedlichen Ladungen zeigen, dass die Elektrogenität der Reaktion nicht konserviert ist und damit für den Mechanismus wahrscheinlich keine zentrale Bedeutung hat.

**Tabelle 20: Vergleich der Ladungsverschiebungen und Ratenkonstanten der *pre steady-state* Komponenten in wt Transportern und OE-Mutanten.** Alle Transporter wurden bei einer LPR von 5 rekonstituiert. Die Ströme wurden mit den jeweiligen Hauptsubstraten bei sättigenden Substratkonzentrationen gemessen. Es ist wahrscheinlich, dass für die *E.coli* Transporter die Zeitauflösung des Systems die ermittelten Ratenkonstanten limitiert und diese tatsächlich höher liegen. Durch Salzsprünge induzierte transiente Ströme auf der SSM zeigen identisch hohe Ratenkonstanten (*Seite 45, Abbildung 14*). **1:** Die Parameter für LacY wurden u.a. aus den Daten in *Abbildung 36a (Seite 106)* und *Tabelle 16 (Seite 87)* abgeleitet. **2:** Die Parameter für XylE wurden u.a. aus den Daten in *Abbildung 36c (Seite 106)* und *Tabelle 16 (Seite 87)* abgeleitet. **3:** Für wt FucP konnte die Ladungsverschiebung nicht isoliert vom *steady-state* betrachtet werden *Abbildung 36e (Seite 106)*, weshalb das Integral eine grobe Abschätzung darstellt. Die Ratenkonstante der Ladungsverschiebung von D46N FucP wurde im Gegensatz zu den übrigen Ratenkonstanten am langsamen Setup bestimmt (*Seite A12, Abbildung 66*), was den geringeren Wert erklärt, der genauso als untere Grenze zu interpretieren ist. **4:** Die Parameter für GlcP wurden u.a. aus den Daten in *Abbildung 41 (Seite 118)* und *Abbildung 42 (Seite 119)* abgeleitet. Hier ist die Zeitauflösung des Systems für die Bestimmung der Ratenkonstante nicht limitierend gewesen. Es handelt sich im Gegensatz zu den übrigen Ratenkonstanten um das tatsächliche  $k_{\text{obs}}$ . **5:** Zu Vergleichszwecken wurden Parameter aus der Literatur für MelB ergänzt [214, 260]. Hier wurde N-Ethylmaleimid (NEM) als Inhibitor des *steady-state* Signals verwendet.

Transporter	Ladung	Ladung	Ratenkonstante
	wt Transporter	OE-Mutante	OE-Mutante
LacY <sup>1</sup>	$2,6 \pm 0,6 \text{ pC (pH 5,0)}$	$3,1 \pm 1,8 \text{ (pH 7,6)}$	$> 300 \pm 80 \text{ s}^{-1}$
XylE <sup>2</sup>	$4,0 \pm 1,4 \text{ pC (pH 3,2)}$	$6,8 \pm 1,5 \text{ (pH 7,6)}$	$> 300 \pm 20 \text{ s}^{-1}$
FucP <sup>3</sup>	$\sim 0,5 \text{ pC (pH 10,5)}$	$-1,2 \pm 0,6 \text{ pC (pH 10,5)}$	$> 100 \pm 20 \text{ s}^{-1}$
GlcP <sup>4</sup>	$11,8 \pm 3,5 \text{ pC (pH 7,5)}$	$2,8 \text{ pC} \pm 1,4 \text{ pC (pH 7,5)}$	$90 \pm 70 \text{ s}^{-1}$
	$-12,7 \pm 3,5 \text{ pC (pH 9,5)}$		$220 \pm 20 \text{ s}^{-1}$
MelB <sup>5</sup>	$12 \text{ pC (pH 7,5+NEM)}$	--	$250 \pm 30 \text{ s}^{-1}$

Von pH 4,5 bis pH 9,5 zeigen die Ladungsverschiebungen und Peak-Ströme der OE-Mutanten eine lineare Abhängigkeit vom pH-Wert (*Abbildung 37*), die in keinem Fall dem Titrationsverhalten einer einzelnen titrierbaren Gruppe entsprechen kann. Die Ladung kann dabei mit steigendem pH-Wert abnehmen (XylE, *Abbildung 37b*), zunehmen (LacY, *Abbildung 37b*), nahezu konstant bleiben (GlcP, *Seite 119, Abbildung 42*) oder erst oberhalb des physiologischen pH-Wertes messbar werden (FucP, *Seite A12, Abbildung 66*). Anzumerken ist, dass mit dem pH-Wert prinzipiell auch eine Vorzeichenumkehr des *pre steady-state* Signals möglich ist. Dies wurde für die L-Fucose-induzierten Signale an D46N FucP (*Seite A12, Abbildung 66*) beobachtet. Zudem deutet sich eine Vorzeichenumkehr für einige sekundäre Substrate an, bei denen der *induced fit* ohnehin eine sehr niedrige Elektrogenität zeigt (z.B. D-Glucose an D27N XylE, *Seite 130, Abbildung 48*). Im Gegensatz zu Messungen der *pre steady-state* Signale bei niedrigen Zucker-Konzentrationen (*Seite 88, Abbildung 29a*), ist bei niedrigen Protonen-Konzentrationen keine Veränderung der Abklingzeit zu erkennen. Die effektive Rate der *pre steady-state* Reaktion ist daher wahrscheinlich unabhängig vom pH-Wert.



**Abbildung 37: pH-Abhängigkeit der *pre steady-state* Reaktionen in E325A LacY und D27N XylE.** (a) Am langsamen Setup detektierte, exemplarische transiente Ströme. (b) Lineare Regression der pH-Abhängigkeit der Peakströme. Die einzelnen Datensätze wurden auf den Peakstrom bei pH 7,5 normiert und gemittelt. Der Peakstrom bei pH 7,5 ist angegeben.

In den wt *E.coli* Transportern ist die *pre steady-state* Reaktion über einen breiten pH-Bereich nicht sichtbar, weil sie von der Elektrogenität im *steady-state* überlagert wird. Dennoch können unter extremen pH-Bedingungen, wenn der *steady-state* inhibiert ist, *pre steady-state* Signale beobachtet werden. Ein Vergleich zwischen den *pre steady-state* Signalen unter extremen pH-Bedingungen bei wt Transportern (*Abbildung 36*) und der pH-Abhängigkeit der OE-Mutanten (*Abbildung 37*) ermöglicht Rückschlüsse, ob die pH-Abhängigkeit der *pre steady-state* Komponenten in wt und Mutanten identisch sein könnte. In *Tabelle 21* ist gegenübergestellt bei welchen pH-Werten in wt Transportern *pre steady-state* Signale detektiert werden können.

**Tabelle 21: Vergleich der pH-Abhängigkeit der *pre steady-state* Signale in wt Transportern und OE-Mutanten.** Es ist gegenübergestellt bei welchen pH-Werten die *pre steady-state* Signale in den wt Transportern sichtbar werden und ob der Peakstrom  $I_p$  in den OE-Mutanten betragsmäßig mit dem pH-Wert zunimmt oder abnimmt. Die pH-Abhängigkeiten der wt Transporter sind in [Abbildung 36 \(Seite 106\)](#), die der OE-Mutanten in [Abbildung 37 \(Seite 108\)](#) bzw. [Abbildung 66 \(Seite A12\)](#) dargestellt.

Transporter	<i>pre steady-state</i> Signal sichtbar im wt		Steigung von $I_p$ vs. pH in der OE-Mutante
	Saurer pH	Basischer pH	
LacY	< pH 5 (klein)	> pH 11 (groß)	Zunahme
FucP	nein	> pH 9	Zunahme
Xyle	< pH 4	nein	Abnahme

In wt Xyle scheint bei stark basischen pH-Werten die *pre steady-state* Komponente zu verschwinden, ebenso wie der *pre steady-state* Peakstrom von D27N Xyle mit basischem pH-Wert abnimmt. In wt LacY ist die *pre steady-state* Komponente im Basischen größer als im Suren. In E325A LacY steigt der *pre steady-state* Peakstrom mit basischem pH-Wert an. In wt FucP wird eine schnelle Komponente erst im basischen pH-Bereich sichtbar. Auch in D46N FucP steigt der Betrag des *pre steady-state* Signals, der im neutralen pH-Bereich verschwindet ([Seite A12, Abbildung 66](#)). Damit sind die pH-Abhängigkeit von wt Transportern und OE-Mutanten miteinander kompatibel. Die pH-Abhängigkeit der *pre steady-state* Signale der OE-Mutante lässt sich sehr wahrscheinlich auf die der wt Transporter übertragen, auch wenn das *steady-state* Signal diese über einen großen pH-Bereich überlagert.

## Einfluss asymmetrischer pH-Werte

Aus den pH-Profilen der Transporter konnten zwei verschiedene pK-Werte abgeleitet werden, die der Protonenbindung (pK<sub>b</sub>) und der Protonenfreisetzung (pK<sub>a</sub>) zugeordnet wurden ([Seite 102, Abbildung 34](#)). Diese beiden Reaktionen finden auf entgegengesetzten Seiten der Membran statt. Da die Protonenbindung deshalb ausschließlich vom pH-Wert außerhalb der Proteoliposomen beeinflusst werden kann, sollte die Inhibition im Basischen abhängig vom äußeren pH-Wert sein. Umgekehrt kann die Protonenfreisetzung nur vom intraliposomalen pH-Wert beeinflusst werden, weshalb die Inhibition im Suren nur vom intraliposomalen pH-Wert abhängig sein sollte. Aus diesem Grund eignen sich Messungen der Transporter-Aktivität unter asymmetrischen pH-Bedingungen, um die Zuordnung der pK-Werte zu den genannten Reaktionen im Transportzyklus zu bestätigen.

## NA-Zeit-Abhängigkeit der Peak-Ströme

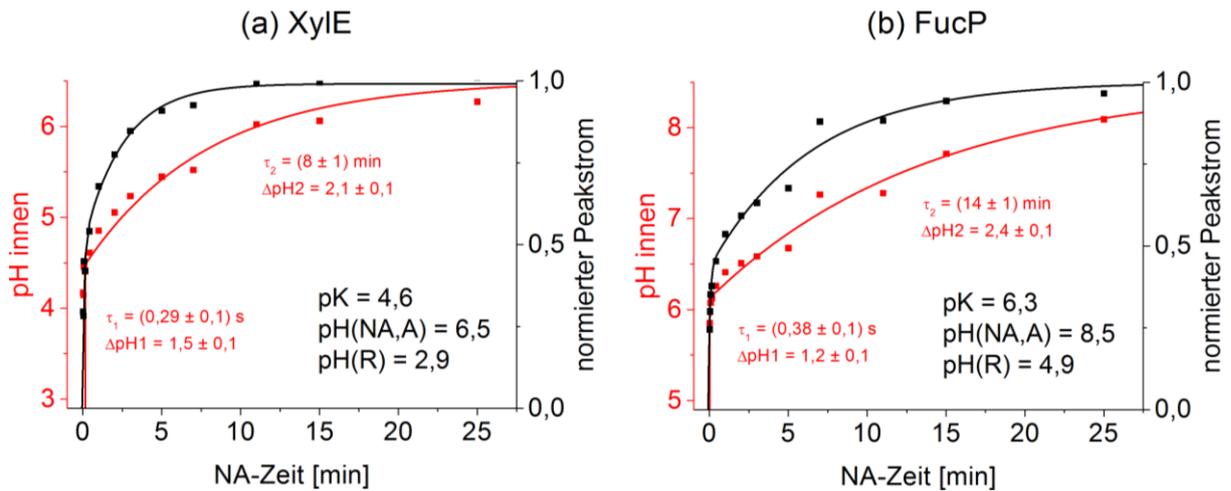
Es wurde gezeigt, dass nach einem pH-Wechsel aufgebaute pH-Gradienten instabil sind ([Seite 92, Abbildung 30](#)). Um die Abhängigkeit des Peak-Stroms vom intraliposomalen pH-Wert zu testen, lässt sich die verzögerte Änderung des inneren pH-Wertes gegenüber der instantanen Änderung des äußeren pH-Wertes ausnutzen. Wenn der innere pH-Wert den Peakstrom definiert, dann sollte sich

der Peakstrom mit steigender Wartezeit nach dem Wechsel zwischen Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten (NA-Zeit, [Seite 47, Abbildung 15b](#)) verändern. Im Experiment findet der Wechsel von der Ruhelösung mit pH(R) zu der NA-Lösung mit pH(NA) statt, gefolgt von der NA-Zeit und der anschließenden Messung des Substrat-induzierten Peakstroms. Der intraliposomale pH-Wert geht mit steigender NA-Zeit stetig von pH(R) in den pH(NA) über. Wenn der Peakstrom nur vom inneren pH-Wert abhängig ist, wird demnach folgendes Verhalten erwartet.

- **Für kurze NA-Zeiten** ist der pH-Gradient maximal und der intraliposomale pH-Wert entspricht noch pH(R). Dann muss der Peakstrom dem Strom unter symmetrischen pH-Bedingungen mit pH(R) ähneln.
- **Für lange NA-Zeiten** ist der pH-Gradient vollständig abgebaut und der intraliposomale pH-Wert entspricht pH(NA). Dann muss der Peakstrom dem Strom unter symmetrischen pH-Bedingungen mit pH(NA) gleichen.
- **Die NA-Zeit-Abhängigkeit** des Peakstroms sollte der Zeit-Abhängigkeit der intraliposomalen pH-Änderung entsprechen, wie sie im Pyranin-Experiment gefunden wurde ([Seite 92, Abbildung 30](#)).

Ist der Peakstrom hingegen nur vom äußeren pH-Wert abhängig, ist der Peakstrom unbeeinflusst von der NA-Zeit. Der Zucker-induzierte Peakstrom erreicht unmittelbar nach dem pH-Sprung einen Wert, der dem Peakstrom unter symmetrischen pH-Bedingungen mit pH(NA) gleicht.

Um die Abhängigkeit der Transporter-Aktivität vom inneren und äußeren pH-Wert zu testen, werden für definierte pH(NA)- und pH(R)-Werte Messungen mit verschiedenen NA-Zeiten durchgeführt. Bei pH-Sprüngen um 3,6 pH-Einheiten, ausgehend vom sauren pH-Wert hin zum pH-Optimum des jeweiligen Transporters, ergibt sich ein mit der NA-Zeit steigender Peakstrom ([Abbildung 38](#)). Für lange NA-Zeiten entspricht der Peakstrom dem Strom unter symmetrischen pH-Bedingungen mit pH(NA). Bereits andere Messungen an der SSM zeigten, dass es etwa 20 Minuten dauert, um den inneren pH-Wert an den äußeren anzugleichen [261]. Damit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Transporter-Aktivität im Bereich des pKa-Wertes ausschließlich vom intraliposomalen pH-Wert bestimmt wird. Unter der Annahme, dass die NA-Zeit-Abhängigkeit der Peakströme der zeitlichen Änderung des inneren pH-Wertes entspricht, kann auf Basis des detektierten Peakstroms direkt der zu diesem Zeitpunkt vorliegende innere pH-Wert berechnet werden. Dafür wird die pH-Abhängigkeit der Peakströme unter symmetrischen pH-Bedingungen ([Seite 102, Abbildung 34](#)) als Kalibrierkurve verwendet. Die NA-Zeit-Abhängigkeit des so berechneten inneren pH-Wertes ([Abbildung 38, rote Kurve](#)) ist für die Proteoliposomen mit wt XylE bzw. wt FucP mit der NA-Zeit-Abhängigkeit der Peakströme gegenübergestellt ([Abbildung 38, schwarze Kurve](#)).



**Abbildung 38: Abhängigkeit des Peakstroms von der NA-Zeit nach pH-Sprung vom Sauren zum pH-Optimum an wt Xyle und wt FucP mit  $\Delta\text{pH} = 3,6$ .** Die NA-Zeit-Abhängigkeit des Peakstroms wurde mittels biexponentieller Funktion gefittet. Die angegebenen Zeitkonstanten und pH-Amplituden für die Zeit-Abhängigkeit des inneren pH-Wertes wurden durch einen Fit mit den Gleichungen G46 und G47 (Seite 58) bestimmt. Nach der Inkubation in R-Lösung mit  $\text{pH}(\text{R})$ , in der sich der intraliposomale pH-Wert einstellt, erfolgt der Fluss der NA-Lösung mit  $\text{pH}(\text{NA})$ , um den pH-Wert der äußeren Lösung auszutauschen. Nach verschiedenen NA-Zeiten erfolgt dann die Messung der Transportaktivität mit der A-Lösung (Seite 47, Abbildung 15b). Da sich während der NA-Zeit der intraliposomale pH-Wert an den der äußeren Lösung angleicht, ist der innere pH-Wert abhängig von der NA-Zeit. In schwarz ist die NA-Zeit-Abhängigkeit der normierten Peakströme dargestellt. In Rot sind die anhand der Peakströme mittels Kalibrierkurve (Seite 102, Abbildung 34a) rückgerechneten inneren pH-Werte gegen die NA-Zeit aufgetragen. Dazu wurde angenommen, dass lediglich der innere pH-Wert Einfluss auf den Peakstrom im pH-Bereich nahe dem  $\text{pK}_a$ -Wert hat. Der innere pH-Wert entspricht dann dem symmetrischen pH-Wert für die pH-Abhängigkeit der Peakströme in Abbildung 34a. Bei pH-Sprüngen vom Sauren zum pH-Optimum ist eine NA-Zeit-Abhängigkeit des inneren pH-Wertes zu erkennen, wie sie auch bei den Pyranin-Messungen bestimmt wurde (Seite 97, Tabelle 18). Bei pH-Sprüngen vom Basischen zum pH-Optimum hingegen liegt keine Abhängigkeit des Peakstroms vom inneren pH-Wert vor (Daten nicht gezeigt).

Es ist deutlich zu erkennen, dass sich der innere pH-Wert biexponentiell an den äußeren pH-Wert angleicht. Dieses Verhalten bezüglich der Stabilität von pH-Gradienten konnte bereits anhand der fluorometrischen Messungen mit Pyranin beobachtet werden (Seite 92, Abbildung 30). Die in Abbildung 38 dargestellten NA-Zeit-Abhängigkeiten resultieren aus pH-Sprüngen vom Sauren ins Basische. Entsprechende pH-Sprünge am Fluorometer ergeben einen stabileren pH-Gradienten als pH-Sprünge in entgegengesetzte Richtung (Seite 93, Abbildung 31). Auf der SSM wurden daher zu vergleichszwecken auch pH-Sprünge in entgegengesetzter Richtung durchgeführt, also vom pH-Optimum ins Saure (Daten nicht gezeigt). Es ergibt sich eine wesentlich schnellere Änderung des Peakstroms mit der NA-Zeit als bei den pH-Sprüngen in entgegengesetzte Richtung, übereinstimmend mit den Ergebnissen der Pyranin-Messungen.

Die am Fluorometer nach pH-Titration ermittelte Zeit-Abhängigkeit des inneren pH-Wertes (Seite 92, Abbildung 30; Seite 97, Tabelle 18) und die über die NA-Zeit-Abhängigkeit der Peakströme auf der SSM indirekt gemessene Zeit-Abhängigkeit des inneren pH-Wertes zeigen trotz zahlreicher Unterschiede in den experimentellen Bedingungen (Probenvorbereitung, Start-pH-Werte, Lösungswechsel vs. Titration, Adsorption vs. Suspension) eine überraschend gute Übereinstimmung. Dies gilt für beide Phasen der pH-Änderung. In der ersten Phase ergeben sich am Fluorometer

Zeitkonstanten zwischen 1 s und 3 s (*Seite 97, Tabelle 18*, XylE und LacY, LPR 5, Avanti *E.coli* Polar Lipid-Extrakt), während auf der SSM Zeitkonstanten von 0,3 s bis 0,4 s bestimmt wurden. Der Anteil der pH-Änderung in der ersten Phase an der gesamten pH-Änderung beträgt in beiden Experimenten etwa 40 %. Die Zeitkonstante für die zweite Phase der pH-Änderung am Fluorometer variiert zwischen 4 und 6 Minuten, während sich im SSM Experiment Zeitkonstanten von 8 und 14 Minuten ergeben. Die Übereinstimmungen zwischen Pyranin- und SSM-Messungen bestätigen, dass die Peakströme tatsächlich vom inneren pH-Wert beeinflusst werden.

Es ist anzumerken, dass die erste Phase der NA-Zeit-Abhängigkeit des Peakstroms nicht nur durch die pH-Änderung bedingt sein könnte. Da elektrogene Transporter eine strikte Potential-Abhängigkeit zeigen (*Seite 18, Abbildung 8*) und innerhalb der ersten Phase der pH-Änderung ein Potential aufgebaut wird (*Seite 95, Tabelle 17*), ergibt sich ein weiterer Einfluss auf den Peakstrom. Das sich aufbauende Potential (innen negativ) hat qualitativ denselben Effekt auf die Transportrate wie die pH-Änderung durch Abbau des Gradienten (innen basisch). Daher hätte die Amplitude der ersten Phase in den SSM-Messungen ( $1,3 \pm 0,1$  bei  $\Delta\text{pH} = 3,6$ ; *Abbildung 38*) signifikant größer sein können, als die Amplitude der ersten Phase in den Pyranin-Experimenten ( $1,4 \pm 0,1$  bei  $\Delta\text{pH} = 3,0$ ; *Seite 97, Tabelle 18*). Tatsächlich sind die Amplituden nahezu identisch. Das sich aufbauende Potential ist daher wahrscheinlich zu gering, um einen signifikanten Effekt auf die Transportrate zu haben. Eine nähere Betrachtung eines möglichen Einflusses des sich aufbauenden Potentials auf die Transporter-Aktivität findet sich auf *Seite 116f*.

Als weitere Kontrolle werden auch pH-Sprünge vom pH-Optimum ins Basische durchgeführt. In diesem pH-Bereich sollte sich keine NA-Zeit-Abhängigkeit des Peakstroms ergeben, da im Bereich des  $\text{pK}_b$ -Wertes lediglich der äußere pH-Wert die Transporter-Aktivität beeinflusst. Tatsächlich wird keine NA-Zeit-Abhängigkeit des Peakstroms beobachtet (*Daten nicht gezeigt*). Dies bestätigt, dass die Inhibition der Transportaktivität im Basischen mit der Inhibition der Protonenbindung außerhalb des Proteoliposoms zusammenhängt und unabhängig vom inneren pH-Wert erfolgt. Im Gegensatz dazu konnte durch die NA-Zeit-Abhängigkeit des Peakstroms wie oben ausgeführt bestätigt werden, dass die Inhibition der Transportaktivität im Sauren mit der Inhibition der Protonenfreisetzung im inneren des Proteoliposoms zusammenhängt.

### **Gradientenmessungen mit minimaler NA-Zeit und Monensin-Kontrollen**

Das Flussprotokoll für Messungen unter asymmetrischen pH-Bedingungen (*Seite 47, Abbildung 15b*) basiert auf der Annahme, dass der pH-Gradient innerhalb der 20-minütigen Inkubationsphase in der Ruhelösung vollständig abgebaut wird, während er innerhalb des 0,5 s andauernden NA-Flusses stabil bleibt. Diese Annahme ist nur bedingt gültig (*Seite 92, Abbildung 30; Seite 111, Abbildung 38*).

Daher müssen die angegebenen pH-Werte der Ruhelösung als Näherung für die tatsächlich vorliegenden inneren pH Werte betrachtet werden. Um den maximalen pH-Gradienten für die ausgewählten pH-Werte der Lösungen zu erhalten, wurde die NA-Zeit in den folgenden Experimenten auf 500 ms reduziert. Daher ist auch möglich, dass der äußere pH-Wert noch nicht vollständig ausgetauscht wurde, sodass  $\text{pH(NA)}$  möglicherweise nicht exakt dem extraliposomalen pH-Wert entspricht.

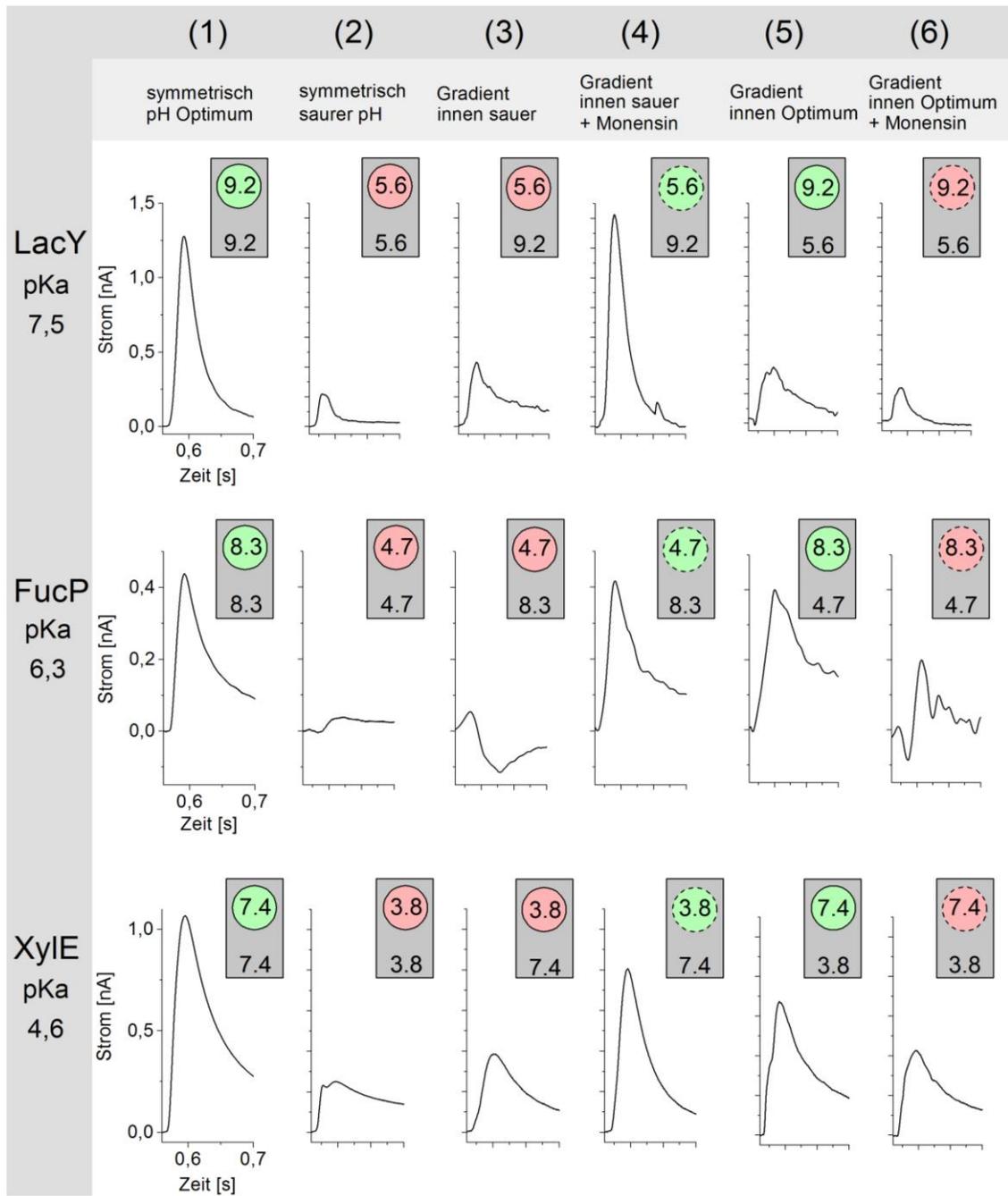
Die pH-Werte der Lösungen wurden so ausgewählt, dass eine maximale Änderung der Transporter-Aktivität erreicht wird. Der pH-Wert der einen Lösung liegt nahe dem pH-Optimum eines Transporters. Der pH-Wert der anderen Lösung unterscheidet sich um 3,6 pH-Einheiten vom pH-Optimum, entweder in Richtung saurem oder in Richtung basischem pH-Wert. Bei diesen extremen pH-Werten zeigt der Transporter nur noch etwa 10 % seiner maximalen Aktivität (*Seite 102, Abbildung 34*). Um einen Einfluss des doppelten Lösungswechsels auf die Transporterströme ausschließen zu können, wurde dieser mit Zusatz des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers Monensin wiederholt. In der Monensin-Kontrollmessung wird der pH-Gradient, der im Flussprotokoll mit doppeltem Lösungswechsel aufgebaut wird, innerhalb der NA-Zeit zerstört. Die Monensin-Kontrolle sollte dieselben Peakströme ergeben wie bei einer Messung mit einfachem Lösungswechsel, bei der sowohl äußerer als auch innerer pH-Wert dem  $\text{pH(NA)}$  entsprechen. Es ist anzumerken, dass Monensin zwar zur Dissipation des pH-Gradienten führt. Da es sich um einen elektroneutralen Austauscher handelt, bleibt das Potential, das sich infolge des pH-Sprungs aufbauen könnte (*Seite 95, Tabelle 17*), zumindest bei niedrigen Monensin-Konzentrationen unbeeinflusst. Die Monensin-Kontrolle ist daher auch eine Möglichkeit zu prüfen, ob sich ein mögliches Potential auf den Transporterstrom auswirkt (für eine nähere Betrachtung, siehe auch *Seite 116f*). Für die Inhibition der Transporter-Aktivität im Sauren pH-Bereich konnte für alle drei Transporter qualitativ dasselbe Ergebnis erhalten werden (*Abbildung 39*).

In den ersten beiden Spalten sind die transienten Ströme aus Messungen mit einfachem Lösungswechsel und symmetrischen pH-Werten für das pH-Optimum (*Spalte 1*) und den um 3,6 pH-Einheiten niedrigeren pH-Wert (*Spalte 2*) des jeweiligen Transporters dargestellt. Die folgenden Spalten zeigen transiente Ströme aus Messungen mit doppeltem Lösungswechsel. Ein saurer pH-Wert innen bewirkt einen niedrigen Peakstrom, unabhängig vom pH-Wert außerhalb des Proteoliposoms (*Spalte 3*). Dieser ist vergleichbar mit dem Strom unter symmetrisch saurem pH-Wert (*Spalte 2*). Mit Monensin (*Spalte 4*) steigt der Peakstrom auf das Niveau der symmetrischen Messung am pH-Optimum (*Spalte 1*), weil der pH-Gradient innerhalb der NA-Zeit abgebaut wird und der innere pH-Wert zum Zeitpunkt der Messung nicht mehr im sauren pH-Bereich, sondern am pH-Optimum liegt. Umgekehrt bewirkt ein Gradient mit basischem pH-Wert innen und saurem

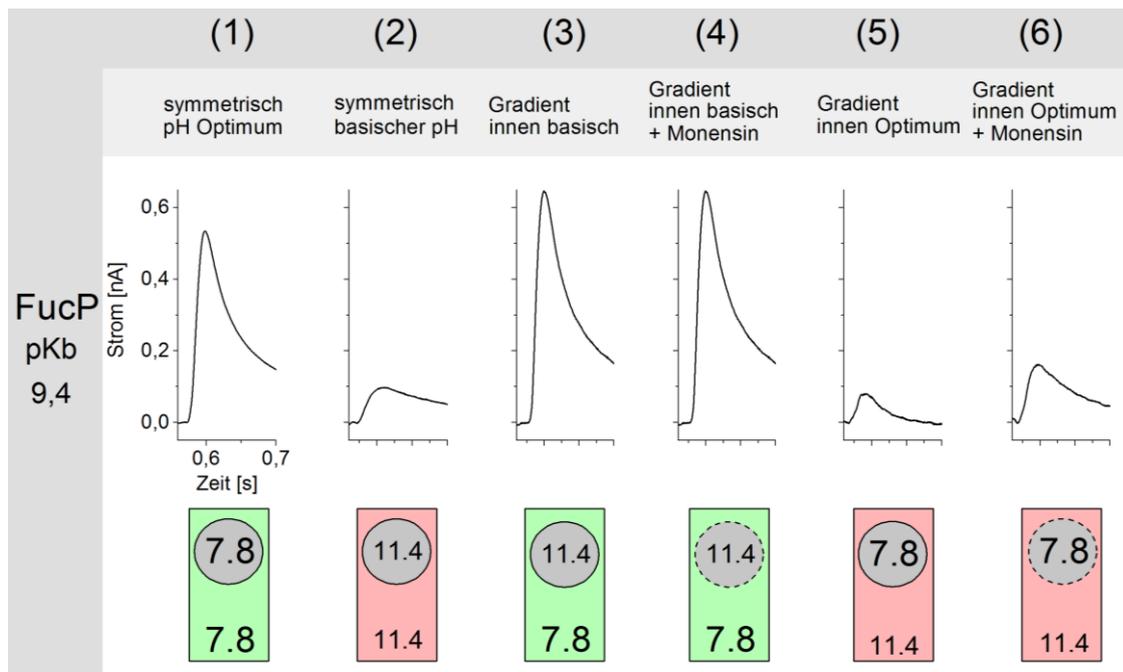
pH-Wert außen (*Spalte 5*) eine Vergrößerung des Peakstroms gegenüber der Monensin-Kontrollmessung (*Spalte 6*), bei der der innere pH-Wert erheblich reduziert ist. Die entsprechenden Peakströme zeigen hier jedoch eine größere Abweichung von den Peakströmen unter symmetrischen pH-Bedingungen (*Spalten 1 bzw. 2*) als die in den *Spalten 3 und 4*. Dies ist möglicherweise dadurch bedingt, dass der pH-Gradient wesentlich schneller abgebaut wird, wenn der intraliposomale pH-Wert basisch gegenüber dem äußeren pH-Wert ist (*Seite 93, Abbildung 31*) als bei umgekehrtem pH-Gradienten.

Da die  $pK_b$ -Werte für LacY und XylE bei extrem basischen pH-Werten liegen, konnten die Gradientenmessungen im basischen pH-Bereich des pH-Profiles nur für FucP durchgeführt werden. Zudem unterscheidet sich der Mechanismus der Inhibition im Basischen in XylE erheblich von dem in LacY und FucP, da zwei  $pK_b$ -Werte existieren (*Seite 102, Abbildung 34*). Für wt FucP konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, dass die Inhibition des Peakstroms im basischen pH-Bereich ausschließlich vom äußeren pH-Wert abhängig ist (*Abbildung 40*).

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Limitierung der Umsatzrate im sauren pH-Bereich durch die Protonenfreisetzung innerhalb des proteoliposomalen Lumens und im basischen pH-Bereich durch die Protonenbindung auf der extraliposomalen Seite erfolgt. Ein pH-Gradient führt jedoch unter keinen Bedingungen zu höheren Peakströmen als unter optimalen symmetrischen pH-Bedingungen. Wenn der äußere pH-Wert sauer ( $< \text{pH-Optimum}$ ) und der innere pH-Wert basisch ( $> \text{pH-Optimum}$ ) gewählt wird, sollten weder Protonenbindung, noch Protonenfreisetzung ratenlimitierend sein. Dennoch ergibt sich ein Peakstrom, der identisch ist mit dem Peakstrom unter optimalen symmetrischen pH-Bedingungen (*Daten nicht gezeigt*). Das breite Aktivitätsplateau im neutralen bis basischen pH-Bereich (*Seite 102, Abbildung 34*) kommt demnach durch die Ratenlimitierung einer dritten Reaktion im Transportzyklus zustande. In der Diskussion wird gezeigt, dass hierfür, abhängig von den äußeren Bedingungen, die Konformationsänderung des leeren oder beladenen Carriers infrage kommen (*Seite 176, Tabelle 29; Seite 177, Abbildung 59*).



**Abbildung 39: Transiente Ströme für LacY, FucP und Xyle unter symmetrischen und asymmetrischen pH-Bedingungen im saurem pH-Bereich.** Alle transienten Ströme desselben Transporters wurden am selben Sensor detektiert. Die Flussprotokolle sind in [Abbildung 15 \(Seite 47\)](#) erläutert. Es wurden die minimale NA-Zeit (0,5 s) und sättigende Zuckerkonzentrationen verwendet. Dargestellt sind die transienten Ströme aus Messungen mit symmetrischen pH-Werten unter Verwendung des einfachen Lösungswechsels (Spalten 1 und 2), aus Messungen mit einem pH-Gradienten von  $\Delta\text{pH} = 3,6$  (Spalten 3 und 5) und aus Messungen mit demselben pH-Gradienten und Zusatz von Monensin (Spalten 4 und 6). Die transienten Ströme 4 und 6 wurden wie die transienten Ströme 3 und 5 aus Messungen mit doppeltem Lösungswechsel erhalten, allerdings wurden in allen Lösungen zusätzlich der elektroneutrale  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher Monensin hinzugefügt, sodass der pH-Gradient innerhalb der 0,5 s andauernden NA-Zeit abgebaut wird. Die pH-Gradienten wurden auf Basis des pKa-Wertes ([Seite 103, Tabelle 19](#)) und pH-Optimums des jeweiligen Transporters ausgewählt, um die Inhibition im sauren pH-Bereich zu untersuchen. Bei den Graphen sind die pH-Werte der Ruhelösung innerhalb der Kreise (intraliposomaler pH) und die pH-Werte der NA- und A-Lösungen außerhalb der Kreise (pH außen) dargestellt. Die Monensin-induzierte Protonenleitfähigkeit entlang der PM ist durch die unterbrochenen Kreise veranschaulicht. Mit Monensin sollte der innere pH-Wert zum Zeitpunkt der Messung dem äußeren pH-Wert entsprechen. Es ist zu erkennen, dass die Peakströme für den sauren pH-Bereich der Titrationskurve ([Seite 102, Abbildung 34](#)) abhängig vom inneren pH-Wert sind. Im basischen pH-Bereich (grün markiert) ergibt sich eine größere Transportrate, im sauren pH-Bereich (rot markiert) ist der Transport inhibiert.



**Abbildung 40: Transiente Ströme für FucP unter symmetrischen und asymmetrischen pH-Bedingungen im basischem pH-Bereich.** Die pH-Gradienten wurden auf Basis des  $pK_b$ -Wertes (Seite 103, Tabelle 19) und pH-Optimums von FucP ausgewählt, um die Inhibition im basischen pH-Bereich zu untersuchen. Es ist zu erkennen, dass die Peakströme für den basischen pH-Bereich der Titrationskurve (Seite 102, Abbildung 34) ausschließlich abhängig vom äußeren pH-Wert sind. Im Sauren  $pH_o$ -Bereich (grün markiert) ergibt sich die maximale Transportrate, im basischen  $pH_o$ -Bereich (rot markiert) ist der Transport inhibiert. Weitere Details sind in Abbildung 39 beschrieben.

### Effekt des Potentials auf die Gradientenmessungen

Messungen mit DISC3(5) haben gezeigt, dass sich unmittelbar nach pH-Sprung ein Potential aufbaut, das für Proteoliposomen bei  $\Delta pH = 3$  im Bereich von bis zu  $-150$  mV liegen kann (Seite 95, Tabelle 17). Elektrogene Transportreaktionen sind stark Potential-abhängig (Seite 18, Abbildung 8). Damit die aus den Gradientenmessungen erhaltenen Peakströme Rückschlüsse auf die reine pH-Abhängigkeit erlauben, muss ausgeschlossen werden, dass das Potential, das sich möglicherweise infolge des pH-Sprungs über der PM aufbaut, nicht auch einen Einfluss auf die Transporter-Aktivität hat.

Innerhalb der ersten Sekunden nach einem pH-Sprung ins Saure ergeben sich eine Azidifizierung des inneren pH-Wertes und ein innen positives Potential. Beides bewirkt eine Inhibition des *steady-state* Symports. Ein pH-Sprung ins Basische ergibt eine Alkalisierung und ein innen negatives Potential, was beides die Umsatzrate im Symport erhöht. Der Effekt des Potentials und der Dissipation des pH-Gradienten ist qualitativ also derselbe. Die beiden Ursachen für die Peakstrom-Änderung lassen sich nicht eindeutig voneinander unterscheiden.

Eine mögliche Kontrolle stellt die Zugabe von Monensin dar. Die Messungen mit Monensin zeigen die Transporter-Aktivität unter Bedingungen, in denen der innere pH-Wert vollständig an den äußeren pH-Wert angeglichen ist (Seite 115, Abbildung 39). Da es sich um einen elektroneutralen Austauscher

handelt, könnte bei niedrigen Konzentrationen das infolge des pH-Sprungs aufgebaute Potential unbeeinflusst bleiben. Bei höheren Konzentrationen kommt es jedoch erst gar nicht zum Aufbau des Potentials, da die Protonen vollständig durch Monensin elektroneutral über die Membran transportiert werden. Zudem beeinflusst Monensin das sich aufbauende Potential selbst, da es die Permeabilitäten für Protonen und Kalium beeinflusst (Seite 8, Gleichung G10). Die Kontrolle ist daher unter keinen Umständen hinreichend, könnte aber einen ersten Hinweis auf den Effekt eines Potentials auf die Transporter-Aktivität liefern. Die Ergebnisse zeigen, dass die Peakströme der Monensin-Kontrollen (Abbildung 39, Spalte 4 bzw. 6) nicht für alle Transporter eindeutig höher bzw. niedriger als die aus pH-symmetrischen Messungen (Abbildung 39, Spalte 1 bzw. 2) sind. So ist es unwahrscheinlich, dass über der PM zum Zeitpunkt der Messung (0,5 s nach pH-Sprung) ein signifikantes Potential anliegt, das die Transporter-Aktivität beeinflussen könnte.

Ein Vergleich zwischen der NA-Zeit-Abhängigkeit der Peakströme (Seite 111, Abbildung 38) und Änderung des inneren pH-Wertes im Pyranin-Experiment (Seite 92, Abbildung 30; Seite 97, Tabelle 18) liefert weitere Hinweise zum möglichem Einfluss des Potentials auf die Transporter-Aktivität. Die Ähnlichkeit der NA-Zeit-Abhängigkeit des inneren pH-Wertes im SSM-Experiment mit der am Fluorometer detektierten Zeit-Abhängigkeit des inneren pH-Wertes zeigt, dass sich auch im SSM-Experiment ein Potential aufbaut. Die ermittelte Zeitkonstante der ersten Phase der pH-Änderung von etwa 300 ms deutet darauf hin, dass sich bereits zum Zeitpunkt der Messung nach 500 ms ein signifikantes Membranpotential aufgebaut hat, das die Transporter-Aktivität beeinflussen könnte. Dennoch ist die Amplitude der ersten Phase im SSM-Experiment nicht größer als die Amplitude der ersten Phase im Pyranin-Experiment. Das sich während der ersten Phase der pH-Änderung aufbauende Potential scheint also keinen Einfluss auf die Transporter-Aktivität zu haben.

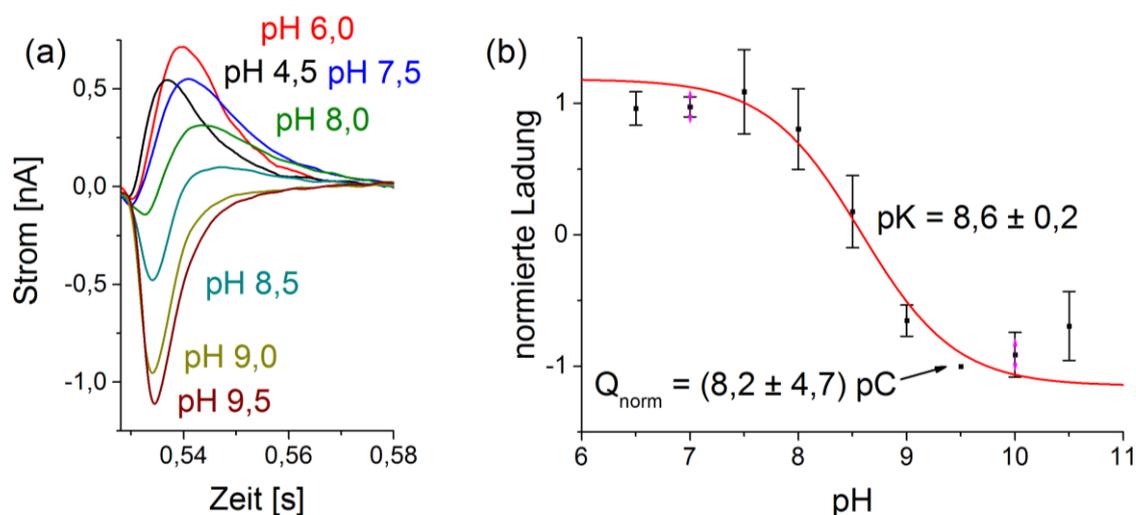
## Messungen an GlcP

GlcP aus *Staphylococcus epidermidis* unterscheidet sich in vielen Punkten von den *E.coli* Transportern LacY, FucP und XylE. So ermöglicht nur GlcP die vollständige Untersuchung der pH-Abhängigkeit des *pre steady-state* Signals am wt Transporter, weil im Gegensatz zu den *E.coli* Transportern das *pre steady-state* Signal im wt unter symmetrischen pH-Bedingungen nicht durch ein *steady-state* Signal überlagert wird (Seite 75, Abbildung 23). Zur Kontrolle wurden nach jeder Messung GLUT-Inhibitoren verwendet, um das GlcP-Signal zu inhibieren (Seite A17, Abbildung 70).

## pH-Abhängigkeit in wt und D22N GlcP an der SSM

Wt GlcP zeigt infolge eines Konzentrationssturzes mit D-Glucose im sauren pH-Bereich transiente Ströme mit positivem Vorzeichen und im basischen pH-Bereich transiente Ströme mit negativem

Vorzeichen (*Abbildung 41a*). Zwischen pH 8 und pH 8,5 werden biphasische Signale erhalten, die sowohl einen positiven als auch einen negativen Peakstrom aufweisen. Zur quantitativen Auswertung der pH-Abhängigkeit Glucose-induzierter Signale können daher nicht die Peakströme verwendet werden, wie für die OE-Mutanten der *E.coli* Transporter (*Seite 108, Abbildung 37*). Aus diesem Grund wird das Peak-Integral bzw. die im Zuge der Reaktion verschobene Ladung gegen den pH-Wert aufgetragen (*Abbildung 41b*). Die pH-Abhängigkeit der Ladungsverschiebung repräsentiert eine Titrationskurve mit einem pK-Wert von 8,6. Die Ladung ändert sich von etwa +10 pC bei pH 7,5 auf etwa -10 pC bei pH 9,5. Die Ladungen unterhalb von pH 7,5 und oberhalb von pH 9,5 zeigen keine ausgeprägte pH-Abhängigkeit. Da es sich um eine Zucker-induzierte *pre steady-state* Reaktion handelt, repräsentiert der pK-Wert von 8,6 sehr wahrscheinlich den pK-Wert der Zuckerbindung.



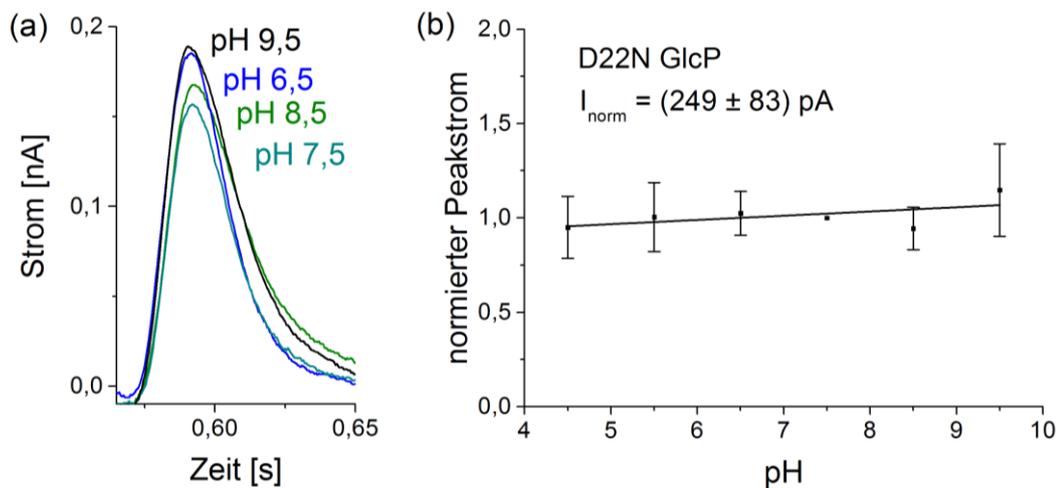
**Abbildung 41: pH-Abhängigkeit der D-Glucose induzierten *pre steady-state* Signale in wt GlcP.** (a) Die transienten Ströme zeigen im leicht basischen pH-Bereich einen Übergang von einer positiven Amplitude in eine negative Amplitude. (b) Ein Fit der Ladungsverschiebungen (Peak-Integrale aus *Abbildung a*) mittels Titrationsgleichung (*Seite 57, Gleichung G43*) im angegebenen Intervall (pink) ergibt einen pK-Wert für die Zuckerbindung von 8,6. Dieser pK-Wert muss der Protonierung der Protonenbindestelle entsprechen, weil er in D22N nicht sichtbar ist (*Abbildung 42*). Gleichzeitig bedeutet der Übergang in eine negative Amplitude, dass der unprotonierte Carrier den Zucker bindet und die Zuckerbindung an den unprotonierten Carrier eine andere Reaktion im Transporter sichtbar macht.

GlcP stammt aus *Staphylococcus epidermidis*, einem Bakterium, das hauptsächlich auf der menschlichen Haut und in Schleimhäuten vorkommt. Im Gegensatz zu den *E.coli* Transportern, die teilweise bei extrem basischen Umgebungs-pH-Werten funktionieren müssen [174, 174, 175, 258], ist GlcP relativ stabilen pH-Werten zwischen pH 4 und pH 6 ausgesetzt [259]. Dies erklärt den im Vergleich zu den *E.coli* Transportern relativ sauren pKb-Wert (*Seite 103, Tabelle 19*).

Interessanterweise wird die Elektrogenität der Zuckerbindung im basischen pH-Bereich nicht auf null herunterreguliert. Stattdessen stellt sich eine Zucker-induzierte negative Ladungsverschiebung ein. Die Ladungsverschiebung infolge der Zuckerbindung an den protonierten Carrier (D22 ist neutralisiert) hat sehr wahrscheinlich dieselbe Ursache wie die entsprechende *pre steady-state*

Ladungsverschiebung in den *E.coli* Transportern (Seite 76, Abbildung 24; Seite 107, Tabelle 20). Die negative Ladungsverschiebung lässt sich dadurch erklären, dass im unprotonierten Zustand ( $\text{pH} > 8,6$ ) die Protonenbindestelle negativ geladen ist und nun zur Ladungsverschiebung einen zusätzlichen negativen Beitrag leistet, der die positive Ladungsverschiebung überkompensiert.

Prinzipiell könnte es sich bei dem gemessenen  $\text{pK}_b$ -Wert auch um die Protonierung einer anderen Aminosäure handeln. Dass es sich um den  $\text{pK}$ -Wert der Protonenbindestelle handelt, wird insbesondere durch eine Beobachtung gestützt: D22N GlcP zeigt für alle getesteten pH-Werte ausschließlich positive transiente Ströme (Abbildung 42). Der OE-Mutante fehlt der negativ geladene Rest, der die negative Ladung transferiert. Der mit wt GlcP bestimmte  $\text{pK}_b$ -Wert muss daher dem  $\text{pK}$ -Wert der Protonenbindestelle entsprechen. Daraus folgt direkt, dass der Zucker auch an den unprotonierten Carrier bindet und eine elektrogene Reaktion im Transporter auslöst.



**Abbildung 42:** pH-Abhängigkeit der D-Glucose induzierten *pre steady-state* Reaktion in D22N GlcP. (a) Die transienten Ströme zeigen keine Änderung mit dem pH-Wert, im Gegensatz zu den Signalen in E325A LacY und D27N XylE (Seite 108, Abbildung 37). (b) Die pH-Abhängigkeit der normierten Peakströme wurde mittels linearer Regression gefittet. Jeder Datensatz wurde auf den Peakstrom bei pH 7,5 normiert. Der Peakstrom bei pH 7,5 ist im Graphen angegeben.

Die Ladungsverschiebung in D22N GlcP zeigt im Rahmen der Standardabweichung im Gegensatz zu E325A LacY und D27N XylE keine pH-Abhängigkeit (Seite 108, Abbildung 37). Wie bei den *E.coli* Transportern zeigen OE-Mutante und wt Transporter für pH-Werte  $< \text{pK}_b$  auch bei GlcP identische Abklingzeiten, sodass der *induced fit* in wt und OE-Mutante mit derselben effektiven Rate stattfindet. Im Gegensatz zu LacY und XylE ist hier die Zeitauflösung des Systems nicht limitierend für die Bestimmung der Abklingzeit. Der *induced fit* ist in GlcP also signifikant langsamer als der in den *E.coli* Transportern (Seite 107, Tabelle 20). Im Gegensatz zu den *E.coli* Transportern unterscheidet sich in GlcP auch die Ladungsverschiebung zwischen wt und OE-Mutante. D22N GlcP zeigt nur etwa ein Drittel der Ladungsverschiebung des Wildtyps. Die entsprechende Mutation hat in GlcP damit einen größeren Einfluss auf die Ladungsverschiebung während des *induced fits*.

Es ist wichtig festzuhalten, dass für wt GlcP unter symmetrischen pH-Bedingungen kein elektrogener *steady-state* detektiert wird (Seite 118, Abbildung 41; Seite 75, Abbildung 23). Die Symport-Reaktion mit Protonen findet unter alleinigem Einfluss eines Zuckergradienten demnach nicht (oder nur mit einer im Vergleich zu den *E.coli* Transportern stark reduzierten Umsatzrate) statt. Möglicherweise katalysiert GlcP unter den vorliegenden Bedingungen Uniport, der im *steady-state* nicht elektrogen ist und somit nicht detektiert werden kann. Tatsächlich deuten Messungen mit radioaktiv markierten Substraten (Seite 125, Abbildung 46) und SSM-Messungen mit pH-Gradienten (Seite 124, Abbildung 45) darauf hin, dass GlcP Uniport katalysiert und für die Symport-Reaktion ein zusätzlicher pH-Gradient erforderlich ist.

### Zuckerspezifität in wt GlcP

Im Gegensatz zu den *E.coli* Transportern, kann bei GlcP der  $K_D$ -Wert der Zuckerbindung am wt Transporter bestimmt werden. Die  $K_D$ -Werte liegen im niedrigen millimolaren Bereich. Sie sind damit signifikant größer als die in der Literatur für GlcP aus *Staphylococcus epidermidis* und *Streptomyces coelicolor* veröffentlichten  $K_M$ -Werte, die zwischen 30  $\mu\text{M}$  und 150  $\mu\text{M}$  liegen [133, 262]. Die großen Differenzen sind wahrscheinlich dadurch bedingt, dass die entsprechenden  $K_M$ -Werte aus Experimenten mit stationärem Transport unter Einfluss eines Membranpotentials abgeleitet wurden. In diesem Sinne zeigt GlcP Ähnlichkeiten zu LacY, wo der auf der SSM bestimmte  $K_D$ -Wert mit 20 mM (Seite 87, Tabelle 16) um einen Faktor 100 größer ist als der  $K_M$ -Wert unter Einfluss eines Membranpotentials [123, 226]. Zudem deutet der im Vergleich zu den  $K_M$ -Werten relativ große  $K_D$ -Wert wie bei LacY darauf hin, dass die Ratenlimitierung im *steady-state* nicht durch die Zuckerbindung, sondern durch eine signifikant langsamere, nachgeschaltete Reaktion erfolgt (Seite 56, Gleichung G37).

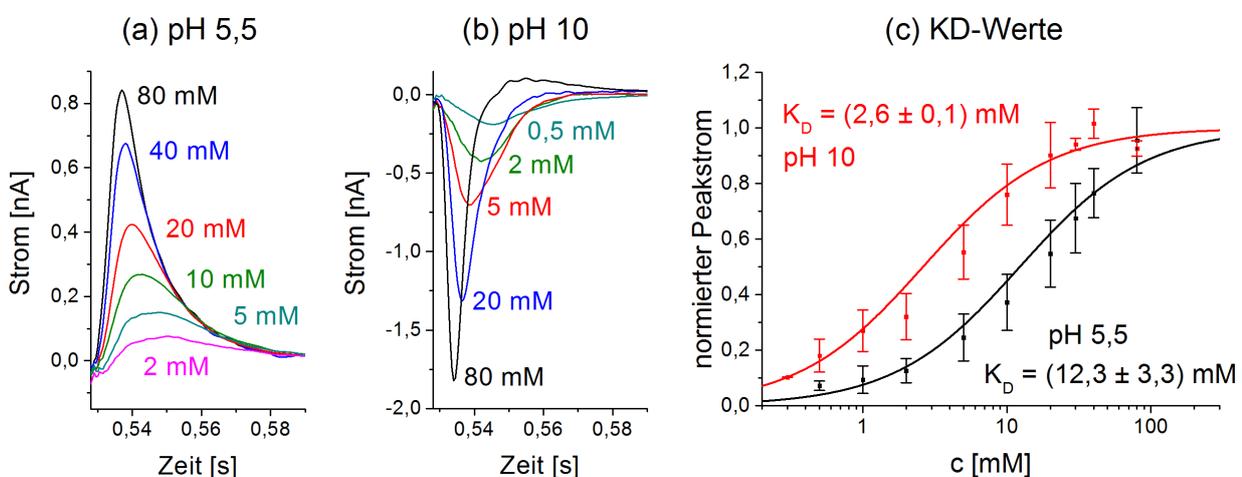
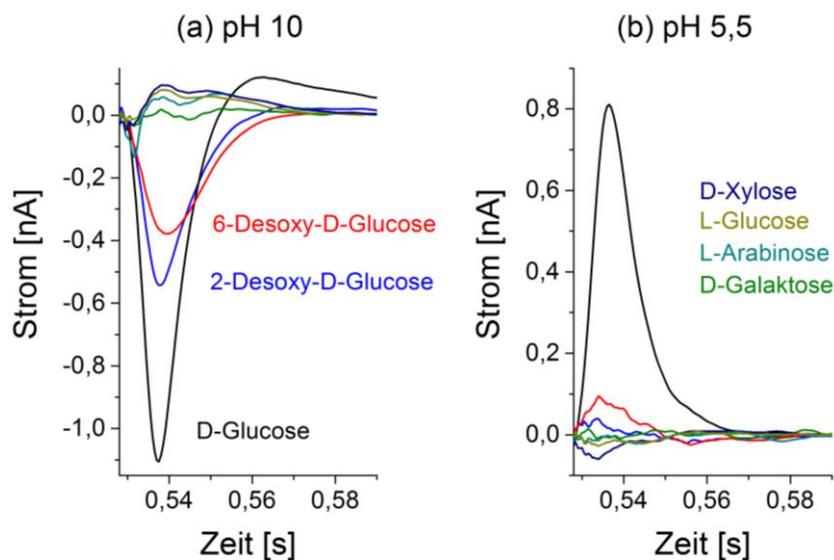


Abbildung 43: Konzentrations-Abhängigkeit der transienten Ströme und dazugehörige  $K_D$ -Plots der Peakströme für D-Glucose induzierte Ströme an wt GlcP für pH 5,5 und pH 10. Die  $K_D$ -Werte wurden mittels Gleichung G32 (Seite 55) bestimmt. Weitere Parameter sind in Tabelle 22 gegenübergestellt.

**Tabelle 22: Parameter D-Glucose induzierter Signale an wt GlcP für pH 5,5 und pH 10.** Zu Vergleichszwecken sind KD-Werte und v<sub>max</sub>-Werte aus dem hyperbolen Fit der Konzentrations-Abhängigkeit sowie Abklingzeiten  $\tau_2$  und Ladungsverschiebungen Q aus den transienten Strömen dargestellt. Der v<sub>max</sub>-Wert entspricht dem Mittelwert aus mindestens drei verschiedenen Messreihen. Die Abklingzeiten und Ladungsverschiebungen wurden aus den Strömen mit maximaler Substratkonzentration abgeleitet. Details hierzu sind auf [Seite 52f](#) beschrieben.

Transporter	pH	Substrat	KD [mM]	v <sub>max</sub>	$\tau_2$ [ms]	Q [pC]
wt GlcP	5,5	D-Glucose	12,3 ± 0,3	1,2 ± 0,1 nA	4,6 ± 0,8	10,1 ± 3,2
	10,0	D-Glucose	2,6 ± 0,1	-2,1 ± 0,4 nA	2,7 ± 0,8	8,5 ± 2,6

Die KD-Werte für die Bindung von D-Glucose an wt GlcP zeigen im Gegensatz zu den KM-Werten der *E.coli* Transporter ([Seite 82, Tabelle 14](#)) eine genau entgegengesetzte Abhängigkeit vom pH-Wert. Bei pH 10 ist die Affinität zum Hauptsubstrat mit 2,6 mM um fast eine Größenordnung höher als bei pH 5,5 ([Abbildung 43](#)). Der Zucker bindet somit affiner an den unprotonierten Carrier als an den protonierten Carrier. Dies ist gleichbedeutend mit einer negativen Kooperativität zwischen Protonen- und Zuckerbindung. Da eine negative Kooperativität im Allgemeinen auf Antiport hinweist, lässt dieses Ergebnis daran zweifeln, dass GlcP ausschließlich Symport katalysiert.



**Abbildung 44: Substratspezifität in wt GlcP bei pH 10 (5 mM Zucker) und pH 5,5 (20 mM Zucker).** (a) Bei pH 10 befindet sich wt GlcP im unprotonierten Zustand ( $pK = 8,6$ ) und bindet D-Glucose sowie 6-Desoxy- und 2-Desoxy-D-Glucose. (b) Bei pH 5,5 ist wt GlcP protoniert. Es induziert ausschließlich D-Glucose ein *pre steady-state* Signal.

Für GlcP aus *Streptomyces coelicolor* wurde 2-Desoxy-D-Glucose als mögliches Substrat diskutiert [\[262\]](#). Viele weitere Zucker konnten für GlcP aus *Staphylococcus epidermidis* als mögliche Substrate ausgeschlossen werden [\[133\]](#). GlcP ist unter Bedingungen, bei denen eine maximale Transportrate für D-Glucose in radioaktiven Transportassays beobachtet wurde (pH 5,5, 20 mM Glucose) hochspezifisch für D-Glucose ([Abbildung 44b](#)). Selbst 2-Desoxy- und 6-Desoxy-D-Glucose induzieren keine *pre steady-state* Ladungsverschiebung, binden also nicht an GlcP. Zusätzlich sind D-Xylose, L-Glucose, L-Arabinose und D-Galactose eindeutig Nichtsubstrate. Interessanterweise gilt dies nicht

für pH 10, wenn der Carrier also im unprotonierten Zustand vorliegt (*Abbildung 44a*). Hier zeigen 2-Desoxy- und 6-Desoxy-D-Glucose eine Ladungsverschiebung von 45 % bzw. 30 % von der D-Glucose-induzierten Ladungsverschiebung. Dies deutet darauf hin, dass der Carrier im unprotonierten Zustand eine geringere Spezifität für sein Hauptsubstrat hat. Eine physiologische Relevanz sollte dies aber nicht haben, da der Carrier *in vivo* ( $\text{pH}_o < 7$ ) den Zucker nur im protonierten Zustand ( $\text{pK} = 8,6$ ) bindet.

## Einfluss eines pH-Gradienten auf den Transportmodus

Unter symmetrischen pH-Bedingungen konnte in wt GlcP kein elektrogener stationärer Transport gefunden werden (*Seite 118, Abbildung 41; Seite 75, Abbildung 23*). Die Umsatzrate des Zuckergradienten-getriebenen Symports ist damit gegenüber LacY, FucP und XylE erheblich reduziert. *In vivo* wird der Glucose-Uptake jedoch mit pH-Gradient und innen negativem Potential angetrieben, sodass die Umsatzrate im Symport-Modus unter diesen Bedingungen beschleunigt sein könnte. Für die *E.coli* Transporter LacY, FucP und XylE konnte gezeigt werden, dass ein pH-Gradient den Symport nicht über die Umsatzrate am pH-Optimum beschleunigen kann (*Daten nicht gezeigt*), weil dort eine dritte Reaktion ratenlimitierend wird. Für GlcP wurden ähnliche Experimente durchgeführt, mit einem anderen Ergebnis.

Für die Messungen an GlcP unter Einfluss eines pH-Gradienten wurden die pH-Werte 5 und 10 gewählt. Wie in *Abbildung 41* gezeigt, ergibt sich unter symmetrischen pH-Bedingungen bei pH 5 ein schneller transienter Strom mit positiver Amplitude, während bei pH 10 ein schneller transienter Strom mit negativer Amplitude gemessen wird. Sowohl die Symmetrie des transienten Stroms als auch die niedrigen Zeitkonstanten weisen darauf hin, dass es sich um ein *pre steady-state* Signal handelt, was auch Messungen mit verschiedenen LPRs bestätigen (*Seite 78, Abbildung 25*). Ein Zuckergradient alleine kann also keinen stationären elektrogenen Transport induzieren.

Ein entsprechender pH-Gradient mit  $\text{pH}(\text{NA}) = 5,0$  ( $\sim \text{pH}_o$ ) und  $\text{pH}(\text{R}) = 10$  ( $\sim \text{pH}_i$ ) könnte theoretisch die Protonenbindung außen sowie die Protonenfreisetzung innen beschleunigen und damit den Symport begünstigen. Der innen basische pH-Wert hat keinen Effekt auf den Peakstrom, der weiterhin von der schnellen *pre steady-state* Komponente definiert ist (*Abbildung 45a*). Für den *pre steady-state* ist demnach wie erwartet ausschließlich der äußere pH-Wert relevant, da lediglich der Protonierungsgrad des auswärtsgerichteten Carriers die Zucker-induzierte *pre steady-state* Ladungsverschiebung beeinflusst. Die Gradientenmessung unterscheidet sich jedoch von der pH-symmetrischen Messung mit pH 5 durch das Auftreten einer zusätzlichen langsamen Komponente positiver Amplitude, die typisch für einwärtsgerichteten stationären Transport von Protonen ist (*Abbildung 45c,e*). Der pH-Gradient wirkt damit als Triebkraft für stationären,

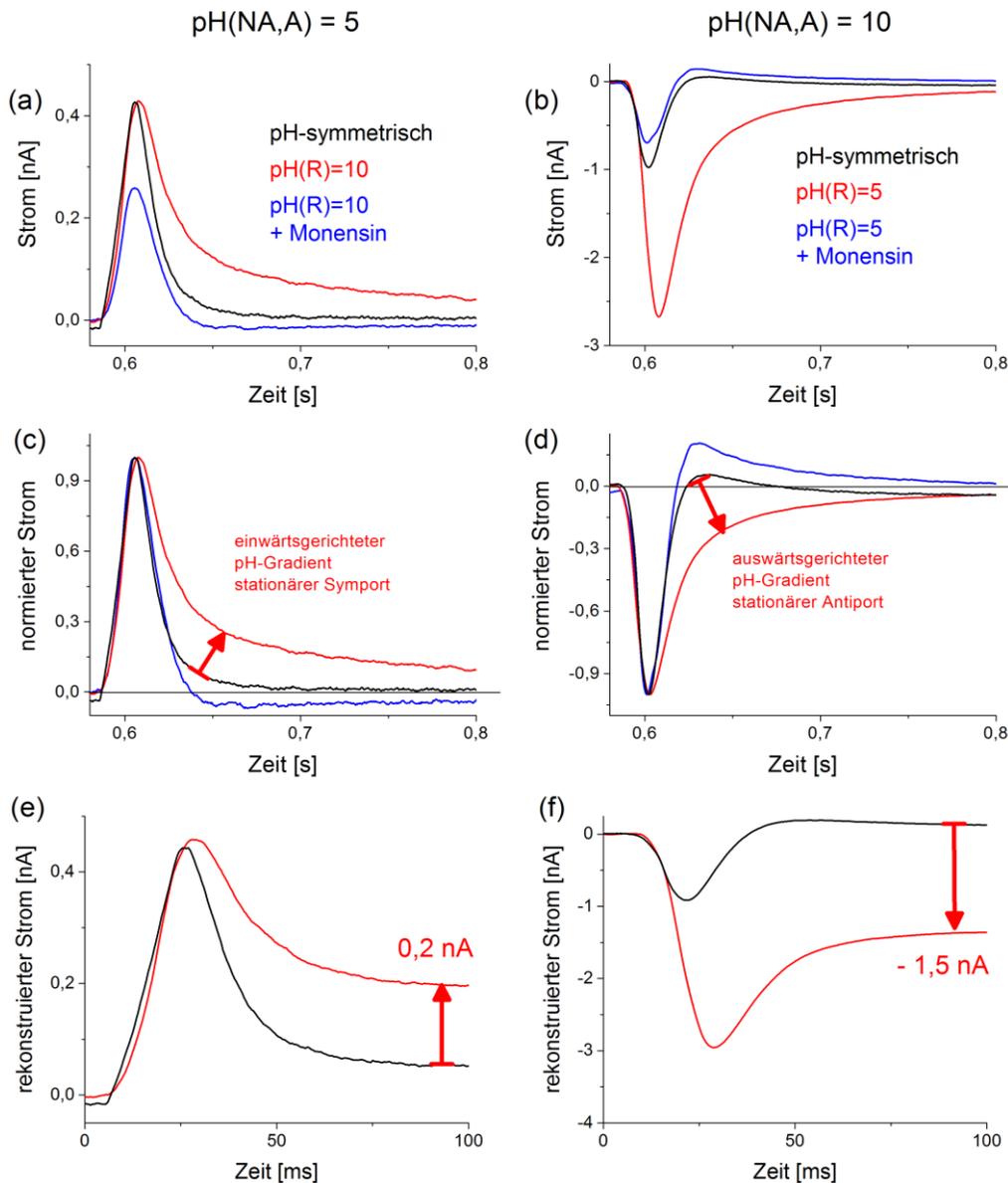
elektrogenen Zucker-Protonen Symport. Aufgrund des pH-Gradienten oder genauer gesagt aufgrund des sauren pH-Wertes außen und des gleichzeitig basischen pH-Wertes innen werden Protonenbindung und Protonenfreisetzung soweit beschleunigt, dass der Protonen-gekoppelte Zucker-*Uptake* elektrophysiologisch messbar wird. Möglicherweise verändert sich das Verhältnis von Uniport zu Symport abhängig vom pH- und Zucker-Gradienten.

Zur Kontrolle wurde die gleiche Messung ( $\text{pH(NA)} = 5,0$ ,  $\text{pH(R)} = 10$ ) mit Zusatz von Monensin wiederholt, sodass der pH-Gradient bei NA-A-Wechsel bereits abgebaut ist (*Abbildung 45, blaue Kurven*). Dabei wurde äquivalent zu der Durchführung der Monensin-Kontrollen in den Experimenten mit den *E.coli* Transportern verfahren (*Seite 115, Abbildung 39*). Mit Monensin verschwindet die langsame Komponente. Das Signal ist vergleichbar mit dem Signal unter pH-symmetrischen Messungen.

Ein pH-Gradient in entgegen gesetzter Richtung mit  $\text{pH(NA)} = 10$  ( $\sim \text{pH}_o$ ) und  $\text{pH(R)} = 5$  ( $\sim \text{pH}_i$ ) müsste analog zur obigen Überlegung die Protonenbindung außen sowie die Protonenfreisetzung innen inhibieren und damit den Symport verhindern. Tatsächlich ist wie erwartet kein positiver, langsamer transienter Strom zu erkennen (*Abbildung 45b*). Es ist jedoch ein wesentlicher Unterschied zu dem schnellen *pre steady-state* Signal unter symmetrischen pH-Bedingungen mit pH 10 festzuhalten. Der Peakstrom unter Einfluss des pH-Gradienten hat zwar dasselbe Vorzeichen, ist aber signifikant größer als unter symmetrischen pH-Bedingungen. Zudem ist eine langsame negative Komponente zu erkennen, die auf einen stationären Transport positiver Ladung aus dem Proteoliposom in den extraliposomalen Raum hinweist (*Abbildung 45d,f*). Diese Effekte sind abhängig vom pH-Gradienten, wie die entsprechende Monensin-Kontrolle zeigt. Das negative Vorzeichen des *steady-state* Signals stimmt mit dem Fluss von Protonen entlang des pH-Gradienten überein. Es liegt demnach die Annahme nahe, dass Protonen vom intraliposomalen Lumen (pH 5) nach außen (pH 10) transportiert werden, sobald ein nach innen gerichteter Zuckergradient anliegt. Dies entspricht einem Antiport von Zucker und Proton.

Zusammengefasst kann ein pH-Gradient sowohl Symport als auch Antiport begünstigen, je nachdem ob pH- und Zucker-Gradient in dieselbe oder entgegen gesetzte Richtungen zeigen. Es ist anzumerken, dass der *steady-state* Strom bei auswärtsgerichtetem pH-Gradienten (1,5 nA) signifikant größer ist als bei einwärtsgerichtetem pH-Gradienten (0,2 nA). Die absoluten *steady-state* Ströme wurden durch Rekonstruktion der transienten Ströme erhalten (*Abbildung 45e,f*). Damit ist die Umsatzrate im Antiport-Modus unter den getesteten Bedingungen signifikant höher als die im Symport-Modus. Dies bestätigt auch die gefundene negative Kooperativität zwischen Zucker- und Protonenbindung in GlcP (*Seite 120, Abbildung 43*), welche im Gegensatz zur gefundenen positiven Kooperativität in den *E.coli* Zuckertransportern (*Seite 82, Tabelle 14*) einen Hinweis auf die

dominierende Antiport-Funktion liefert. In der Diskussion wird ein kinetisches Modell vorgestellt, das den Zuckertransport *in vivo* unter Berücksichtigung der hier gefundenen Ergebnisse als klassischen Symport-Modus beschreibt (Seite 195, Abbildung 63a). Denn *in vivo* begünstigen pH-Gradient und Membranpotential den Symport, während gleichzeitig der Antiport inhibiert wird.

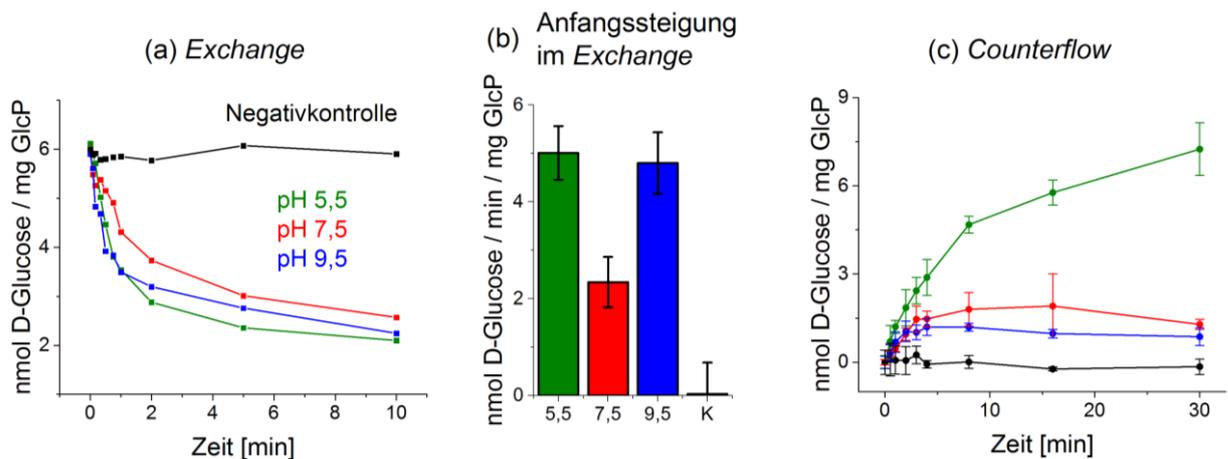


**Abbildung 45: Einfluss eines pH-Gradienten auf die Transporter-Aktivität von wt GlcP.** (a,b) zeigt die detektierten transienten Ströme, (c,d) zeigt die auf den Peakstrom normierten transienten Ströme und (e,f) die rekonstruierten *steady-state* Transporter-Ströme (Seite 59, Gleichung G48). Links sind jeweils die transienten Ströme für pH(NA,A) = 5, rechts die für pH(NA,A) = 10 gezeigt. In schwarz sind die transienten Ströme aus den jeweiligen pH-symmetrischen Messungen gezeigt. Ein einwärtsgerichteter pH-Gradient mit  $\Delta\text{pH} = 5$  beschleunigt den Protonen-gekoppelten Zucker-Symport (links, rote Kurve), während ein auswärtsgerichteter pH-Gradient mit  $\Delta\text{pH} = 5$  einen Protonen-Zucker Antiport ermöglicht (rechts, rote Kurve). Dies geht aus dem Auftreten einer zusätzlichen langsamen Komponente hervor (siehe Pfeile), die den *steady-state* Anteil des Signals repräsentiert, wie auch die rekonstruierten Transporterströme (e,f) zeigen. Die Rekonstruktion zeigt ebenso, dass die stationäre Komponente des Signals im Antiport-Modus (rechts, - 1,5 nA) um fast eine Größenordnung größer ist als im Symport-Modus (links, 0,2 nA). Die *pre steady-state* Komponente, die durch den Peakstrom und den Anstieg des Signals charakterisiert ist, ist dagegen in der Rekonstruktion und im kapazitiv gekoppelten Signal nahezu identisch. Dieselben Gradientenmessungen mit Zusatz von 5  $\mu\text{M}$  Monensin heben diese Effekte wieder auf (blaue Kurven), weil der pH-Gradient vor dem Fluss der A-Lösung bereits abgebaut ist. Die Flussprotokolle sind in Abbildung 15 (Seite 47) dargestellt. Ähnliche Experimente wurden auch für die *E.coli* Transporter durchgeführt (Seite 115, Abbildung 39).

## pH-Abhängigkeit des Zucker-Austauschs im radioaktiven Transportassay

Elektrophysiologische Messungen haben gezeigt, dass D-Glucose auch an den unprotonierten Carrier bindet ([Seite 118, Abbildung 41](#)). Ob dieser Bindung jedoch eine Zucker-Freisetzung auf der anderen Seite der Membran folgt, kann aus dem SSM-Experiment nicht gefolgert werden.

Bei pH 9,5 liegt der Transporter zu etwa 90 % im unprotonierten Zustand vor ( $pK = 8,6$ ). Sollte ausschließlich die Zuckerbindung an den protonierten Carrier zur Zucker-Freisetzung auf der anderen Seite der Membran führen, so müsste die Zucker-Austausch-Aktivität bei pH 9,5 etwa 10 % der Zucker-Austausch-Aktivität bei pH 5,5 entsprechen. Die Zucker-Austausch-Aktivität wurde in einem Transportassay mit radioaktiv markierter D-Glucose gemessen ([Abbildung 46a,b](#)). Die experimentelle Vorgehensweise ist auf [Seite 72f](#) beschrieben. Die Anfangssteigung wurde als Maß für die Geschwindigkeit des Zucker-Austauschs verwendet ([Abbildung 46b](#)). Es ist zu erkennen, dass die Zucker-Austausch-Raten bei pH 5,5 und pH 9,5 identisch sind. Damit müssen die Raten der Zucker-induzierten Konformationsänderungen im unprotonierten und protonierten Carrier sehr ähnlich sein. Sowohl der protonierte Carrier als auch der unprotonierte Carrier ist in der Lage Zucker-Exchange zu katalysieren.



**Abbildung 46: pH-Abhängigkeit des D-Glucose Transports im radioaktiven Transportassay.** Details zu den experimentellen Bedingungen sind auf [Seite 72f](#) gegeben. (a) Das *Exchange*-Experiment wurde bis  $t = 10$  min einmal durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zeitpunkte 0 s, 8 s, 16 s, 24 s und 32 s in Triplikaten gemessen, die Datenpunkte gemittelt und mit linearer Regression die Anfangssteigung bestimmt. (c) Anfangssteigungen aus dem *Exchange*-Experiment. (c) Das *Counterflow*-Experiment wurde in Triplikaten gemessen und gemittelt. Von jedem Datenpunkt wurde die cpm bei  $t = 0$  s des entsprechenden pH-Wertes subtrahiert.

Wenn im unprotonierten Carrier Zucker-Austausch katalysiert wird, dann muss GlcP auch die Fähigkeit zum Uniport aufweisen. Die einzige Voraussetzung hierfür ist, dass der leere Carrier die Membran passieren kann, was indirekt durch die Symport-Aktivität gezeigt werden konnte ([Abbildung 45](#)). Gleichzeitig bedeutet ein Zucker-Austausch im unprotonierten Carrier, dass in GlcP die Protonentranslokation und die Zuckertranslokation nicht strikt gekoppelt sind. Eine schlechte

oder fehlende Kopplung wurde bereits durch die Ergebnisse der SSM-Messungen unter Einfluss eines pH-Gradienten impliziert (*Seite 124, Abbildung 45*). Diese zeigen, dass GlcP sowohl zum Symport als auch zum Antiport befähigt ist.

Im Gegensatz zu den *Exchange*-Messungen zeigen *Counterflow*-Messungen eine pH-Abhängigkeit (*Abbildung 46c*). Die für GlcP gefundene Zeit-Abhängigkeit der Transport-Aktivität im *Counterflow*-Experiment stimmt mit der aus der Literatur überein [133]. Bei pH 5,5 sind sowohl Anfangssteigung als auch die maximalen *cpm* größer als im basischen pH-Bereich. Diese pH-Abhängigkeit ergibt sich aus der Beschleunigung der Efflux-Aktivität im Basischen. Bei Protonenmangel wird die Protonenfreisetzung außen und damit die Efflux-Aktivität beschleunigt, sodass die (pH-unabhängige) *Exchange*-Aktivität zu einer geringeren Akkumulierung radioaktiv markierter Glucose führt.

## D-Glucose und XylE

Transportassays mit radioaktiv markierter Glucose haben gezeigt, dass D-Glucose zwar an wt XylE bindet, aber nicht transportiert wird [132, 144, 236]. Sowohl im *Counterflow*- [144] als auch im *Uptake*-Assay [132] liegt der Glucose-Transport mit weniger als 1 % des Xylose-Transports unterhalb der Detektionsgrenze. D-Glucose induziert jedoch im physiologischen pH-Bereich langsame transiente Ströme, deren Amplituden etwa 25 % der von Xylose-induzierten Strömen ausmachen (*Seite 85, Tabelle 15*). Diese Diskrepanz (*Tabelle 23*) wird weiter dadurch verstärkt, dass im SSM-Experiment der Zuckergradient alleinige Triebkraft darstellt, während im radioaktiven *Uptake*-Assay sowohl Potential als auch Zuckergradient anliegen und sich somit im radioaktiven *Uptake*-Assay theoretisch eine größere Transportrate als im SSM-Experiment ergeben könnte. Dieser Vergleich deutet bereits darauf hin, dass es sich bei dem D-Glucose Signal auf der SSM nicht um ein *steady-state* Signal handeln kann.

SSM-Messungen mit verschiedenen LPRs bestätigen, dass der Glucose-induzierte transiente Strom trotz Ähnlichkeit zum D-Xylose-induzierten Signal kein *steady-state* Signal darstellt (*Seite 79, Tabelle 13; Seite 78, Abbildung 25*). Wenn es sich tatsächlich um eine *pre steady-state* Reaktion handeln sollte, kann die Ladungsverschiebung nicht mehr als einer Elementarladung pro Transporter entsprechen. In der Diskussion auf *Seite 158f* ist dargestellt, dass eine Elementarladung pro Transporter auf der SSM etwa  $25 \pm 4$  pC entspricht. Die Ladung des D-Glucose induzierten Signals an wt XylE stimmt mit  $30 \pm 8$  pC (30 mM, 6 Sensoren, jeweils 2 - 3 verschiedene pH-Werte) im Rahmen der Standardabweichung mit diesem Wert überein. Auch diese Betrachtung bestätigt, dass es sich um eine *pre steady-state* Reaktion handeln könnte. Das *pre steady-state* Signal von D-Glucose an wt XylE unterscheidet sich jedoch signifikant von den Charakteristika des schnellen *induced fits*, der sonst in OE-Mutanten und wt Transportern von LacY, XylE und GlcP als *pre steady-state* Signal

beobachtet wird (Seite 107, Tabelle 20). Das Glucose-induzierte Signal hat eine Abklingzeit von etwa 33 ms (Seite 79, Tabelle 13). Die elektrogene Reaktion von D-Glucose mit XylE ist damit einerseits signifikant langsamer ( $30 \text{ s}^{-1}$  vs.  $> 300 \text{ s}^{-1}$ ) und transferiert andererseits eine wesentlich größere Ladung (30 pC vs. 0,5 - 10 pC) als die *pre steady-state* Reaktion, die dem *induced fit* zugeordnet wurde. Es handelt sich also sehr wahrscheinlich nicht um den *induced fit*.

**Tabelle 23: Vergleich zwischen Glucose- und Xylose-Transportaktivität im radioaktiven Counterflow-Assay und Peakströme auf der SSM für verschiedene XylE Varianten.** Die Prozentangaben für das radioaktive Counterflow-Experiment und die detektierten Ströme auf der SSM sind jeweils auf den D-Xylose-Transport des wt im Counterflow- bzw. SSM-Experiment normiert (100 %, blau markiert). Die Angaben zu den Strömen beziehen sich auf die Peakströme bzw. die rekonstruierten Transporter-Ströme bei 30 mM D-Glucose und pH 7,5. Sie repräsentieren Mittelwerte mit Fehlern zwischen 10 % und 20 %. Es ist bereits bei diesem Vergleich zu erkennen, dass der D-Glucose induzierte, langsame transiente Strom nicht mit dem Ergebnis der Counterflow-Experimente korreliert (rot markiert). Dagegen stimmt der D-Glucose-induzierte Transporter-Strom in Q175I/L297F XylE sehr gut mit der Aktivität im radioaktiven Counterflow-Experiment überein (grün markiert). Die Daten zu den radioaktiven Counterflow- und Uptake-Assays wurden nach Madej et al. [144] bzw. Sun et al. [132] übernommen.

XylE Variante	Transienter Strom	D-Glucose		D-Xylose	
		SSM	Counterflow	SSM	Counterflow
wt	schnell	/	< 1 %	/	100 %
	langsam	0,5 nA (20 %)		2,5 nA (100 %)	
D27N	schnell	0,1 nA	/	0,5 nA	90 % (kein Uptake)
	langsam	/		/	
Q175I/L297F	schnell	0,3 nA	10 %	0,7 nA	75 %
	langsam	0,2 nA (10 %)		0,4 nA (20 %)	

Gibt es einen evolutionären Hintergrund, weshalb D-Glucose an XylE bindet, aber nicht transportiert wird? Prinzipiell könnte die strukturelle Verwandtschaft der Zucker dafür verantwortlich sein, dass eine für D-Xylose optimierte Bindetasche automatisch eine Affinität für D-Glucose aufweist. So ist kein D-Xylose-Transporter bekannt, der D-Xylose gegenüber D-Glucose aufgrund einer erhöhten Selektivität oder Affinität bevorzugt [263–265]. Dem steht jedoch ein gentechnisch hergestellter D-Xylose-Transporter gegenüber, der nicht mit D-Glucose interagiert [266]. Daher könnte es sich möglicherweise um einen für *E.coli* vorteilhaften Mechanismus handeln, der die Aufnahme von D-Xylose verhindert, wenn ein Überschuss an D-Glucose verfügbar ist. In *E.coli* sind mehrere Mechanismen der Katabolit-Repression bekannt, welche die Aufnahme und Metabolisierung exotischer Zucker bei Überschuss von D-Glucose verhindern [267]. So ist D-Glucose dem Energiestoffwechsel leichter zuzuführen und ermöglicht daher ein schnelleres Wachstum. Für die Umwandlung von D-Xylose ist dagegen die Expression weiterer Enzyme erforderlich. So wird D-Xylose von der Xylose-Isomerase (XylA) in D-Xylulose und anschließend durch die Xylulokinase (XylB) in D-Xylulose-5-Phosphat umgewandelt und geht erst dann in den reduktiven Teil des

Pentosephosphatwegs ein [268]. Die elektrophysiologischen Messungen mit D-Glucose könnten wichtige Beiträge zum Verständnis eines speziellen Mechanismus der Katabolit-Repression liefern.

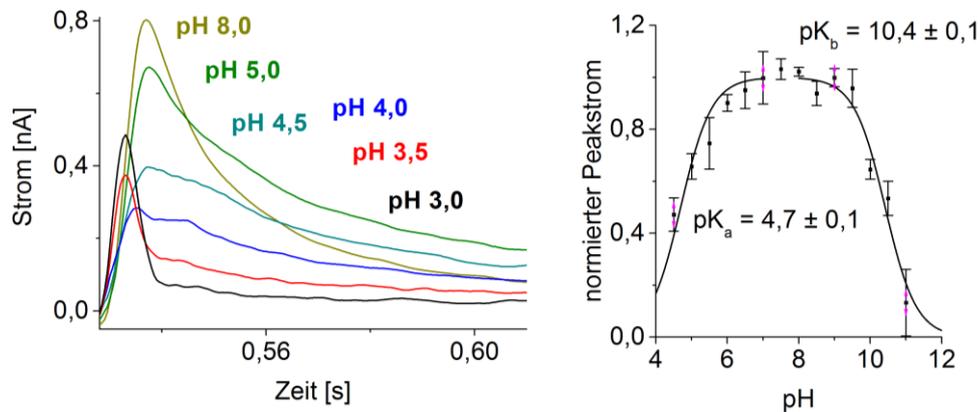
## D-Glucose und wt Xyle

Die pH-Abhängigkeit D-Glucose-induzierter Signale an wt Xyle zeigt, dass der Peakstrom des langsamen transienten Stroms im sauren pH-Bereich abnimmt (Abbildung 47). Unterhalb von pH 4 dominiert ein schneller transienter Strom, wie er auch im sauren pH-Bereich für D-Xylose-induzierte Signale beobachtet wird (Seite 106, Abbildung 36c) und typisch für die OE-Mutanten ist (Seite 108, Abbildung 37). Dies ermöglicht den Rückschluss, dass der *induced fit* des Glucose-Moleküls in ihrer effektiven Rate im Vergleich zum *induced fit* von Xylose unbeeinträchtigt ist. Es ist jedoch anzumerken, dass eine gewisse Änderung der effektiven Rate nicht auszuschließen ist, da die Zeitauflösung des Systems die messbare effektive Rate limitieren könnte. Dennoch kann der langsame transiente Strom wie bereits oben vermutet nicht dem *induced fit* entsprechen, sondern muss eine Reaktion im Transportzyklus nach dem *induced fit* repräsentieren.

Die Abnahme des D-Glucose-induzierten Peakstroms im sauren pH-Bereich hat einen ähnlichen pKa-Wert wie der *steady-state* von D-Xylose (Seite 131, Tabelle 24). Dies deutet darauf hin, dass die Protonenfreisetzung stattfindet und in diesem pH-Bereich ratenlimitierend für die langsame Komponente des Signals ist. Mit der Beobachtung, dass D-Glucose nicht transportiert wird, ergibt sich direkt, dass die Protonenfreisetzung vor der Zuckerfreisetzung erfolgen muss. Bereits für den Transport von D-Xylose wurde vermutet, dass die Protonenfreisetzung vor der Zuckerfreisetzung erfolgen könnte [142]. Es könnte sich aber auch um eine Besonderheit von D-Glucose handeln, sodass dieser Zucker die Protonen-Translokation von der Zucker-Translokation entkoppelt.

Die pH-Abhängigkeit von D-Xylose- und D-Glucose-induzierten, langsamen, transienten Strömen unterscheidet sich bezüglich der Inhibition der Transporter-Aktivität im basischen pH-Bereich. Während für D-Xylose eine biphasische Inhibition mit zwei pKb-Werten zu beobachten ist (Seite 102, Abbildung 34b), erfolgt die Inhibition des D-Glucose-induzierten Signals nach einer klassischen Titrationskurve mit nur einem pKb-Wert (10,4). Der für den D-Xylose-Transport gefundene pKb1-Wert (7,7) hat auf die D-Glucose-induzierten Signale keinen Einfluss. Dagegen entspricht der pKb2-Wert für den D-Xylose-Transport (10,6) in etwa dem pKb-Wert der D-Glucose-induzierten Signale (Seite 131, Tabelle 24). Die Protonierung der dem pKb1-Wert zuzuordnenden Aminosäure moduliert damit lediglich den *steady-state*, aber nicht die langsame *pre steady-state* Komponente des D-Glucose-induzierten Signals. Diese Beobachtung bestätigt, dass es sich bei dem pKb2-Wert um den pKb-Wert der Zuckerbindung handelt (Seite 83, Abbildung 27).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die langsame Komponente des D-Glucose-induzierten Signals sowohl von der Protonenbindung im basischen pH-Bereich als auch von der Protonenfreisetzung im sauren pH-Bereich beeinflusst wird. In dieser Hinsicht zeigt das Signal Ähnlichkeiten zum Verhalten der *steady-state* Signale (Seite 102, Abbildung 34).

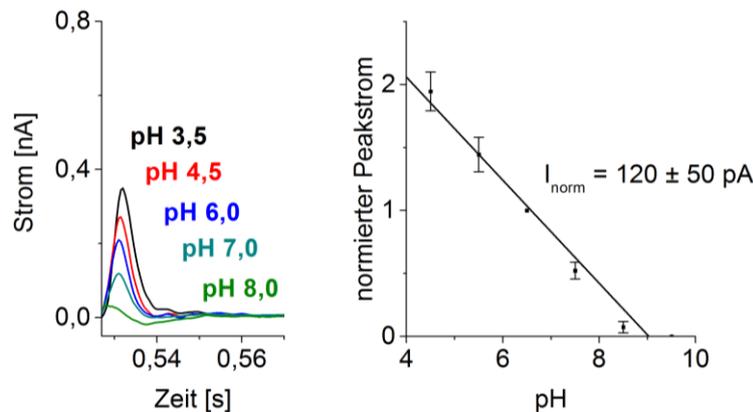


**Abbildung 47: pH-Abhängigkeit D-Glucose-induzierter Signale an wt Xyle.** Links sind repräsentative transiente Ströme, rechts die normierten, gemittelten Peakströme gezeigt. Die pH-Abhängigkeit wurde mittels Titrationsgleichung in den entsprechend angegebenen Intervallen (pink) gefittet (Seite 57, Gleichungen G40 bzw. G41). In radioaktiven Transportassays wurde gezeigt, dass wt Xyle keinen Glucose-Uptake katalysiert, aber Glucose bindet [132]. Der elektrogene, schnelle *induced fit* wird für D-Glucose demgemäß beobachtet. In wt Xyle ergibt sich jedoch wider Erwarten eine zusätzliche langsame elektrogene *pre steady-state* Komponente, deren Amplitude von der Protonenfreisetzung im sauren pH-Bereich und von der Protonenbindung im basischen pH-Bereich moduliert wird.

## D-Glucose und D27N Xyle

Die OE-Mutante D27N Xyle zeigt nach Glucose-Sprung Signale (Abbildung 48), die in ihrer Amplitude und Abklingzeit vergleichbar sind mit den D-Glucose-induzierten Signalen des wt im sauren pH-Bereich (Abbildung 47). Ein langsamer transienter Strom wird für keinen pH-Wert detektiert, was bestätigt, dass der langsame transiente Strom in wt Xyle mit der Protonenfreisetzung korreliert, die in D27N Xyle aufgrund der Mutation der Protonenbindestelle nicht möglich ist.

Der Peakstrom des schnellen transienten Stroms zeigt eine lineare pH-Abhängigkeit (Abbildung 48), ähnlich wie für D-Xylose induzierte Signale an D27N Xyle beschrieben (Seite 108, Abbildung 37). Der Peakstrom und die Ladungsverschiebung sind für D-Glucose bei allen getesteten pH-Werten signifikant niedriger als die der D-Xylose-induzierten Ströme, was bereits für den physiologischen pH-Bereich im Rahmen der Zuckerspezifität diskutiert wurde (Seite 88, Abbildung 29a). Die Bindung von D-Glucose induziert einen anderen Transporter-Zustand als D-Xylose. Interessanterweise verschwindet das Glucose-induzierte *pre steady-state* Signal bei pH 8,5 vollständig, sodass sich bei diesem pH-Wert alle Ladungsverschiebungen während des *induced fits* gegenseitig aufheben müssen.



**Abbildung 48: pH-Abhängigkeit D-Glucose-induzierter Signale an D27N XylE.** Links sind repräsentative transiente Ströme, rechts die normierten, gemittelten Peakströme gezeigt. Die Datensätze für D27N XylE wurden auf den Peakstrom bei pH 7,5 normiert, gemittelt und mittels linearer Regression gefittet. Die pH-Abhängigkeit ist vergleichbar mit der von D-Xylose (Seite 108, Abbildung 37b), wobei die D-Glucose-induzierten Signale für alle pH-Werte eine niedrigere Amplitude zeigen.

### D-Glucose und Q175I/L297F XylE

XylE und GLUT1 zeigen mit 29,7 % Identität und 50,5 % Ähnlichkeit im *pairwise alignment* einen hohen Grad der Verwandtschaft, haben jedoch unterschiedliche Substratspezifitäten: Das Hauptsubstrat von GLUT1 ist D-Glucose [112], ein Substrat, das zwar an XylE bindet, aber nicht transportiert wird [132]. Q175I/L297F XylE wurde so entworfen, dass zwei konservierte Reste innerhalb der Zucker-Bindetaschen von GLUT1-4 in XylE eingeführt werden, mit dem Ziel einen stationären Transport von D-Glucose zu ermöglichen [144]. Sowohl Q175 als auch L297 befinden sich innerhalb der Zucker-Bindetasche in der Nähe der C6-Hydroxylgruppe der gebundenen D-Glucose. In radioaktiven Transportassays konnte gezeigt werden, dass Q175I/L297F XylE tatsächlich Glucose transportiert. Die Umsatzrate des Glucose-Transports in Q175I/L297F XylE entspricht etwa 10 % der Umsatzrate des Xylose-Transports in wt XylE [144] (Seite 127, Tabelle 23). Insgesamt nähern sich alle diskutierten Parameter für D-Glucose (KM-Wert, pKb-Werte, Ladungsverschiebung im *induced fit*) durch die Doppelmutation an die Parameter von wt XylE für D-Xylose an (Tabelle 24).

Auf der SSM zeigt Q175I/L297F XylE für D-Glucose einen schnellen transienten Strom bei allen pH-Werten. Die pH-Abhängigkeit ist linear und vergleichbar mit der pH-Abhängigkeit der D-Glucose- und D-Xylose-induzierten *pre steady-state* Signale in D27N XylE (Abbildung 48; Seite 108, Abbildung 37b). Auch die Abklingzeit ist identisch mit der des schnellen transienten Stroms in D27N XylE und wt XylE im sauren pH-Bereich (Seite 106, Abbildung 36c). Die D-Glucose-induzierte Ladungsverschiebung in Q175I/L297F XylE (Abbildung 49b) ist im Vergleich zu den D-Glucose-induzierten Ladungsverschiebungen in D27N XylE (Abbildung 48) jedoch signifikant vergrößert. Der *induced fit* von D-Glucose induziert in Q175I/L297F XylE damit einen anderen Transporter-Zustand. Tatsächlich liegt die D-Glucose-induzierte Ladungsverschiebung in Q175I/L297F XylE in der Größenordnung der

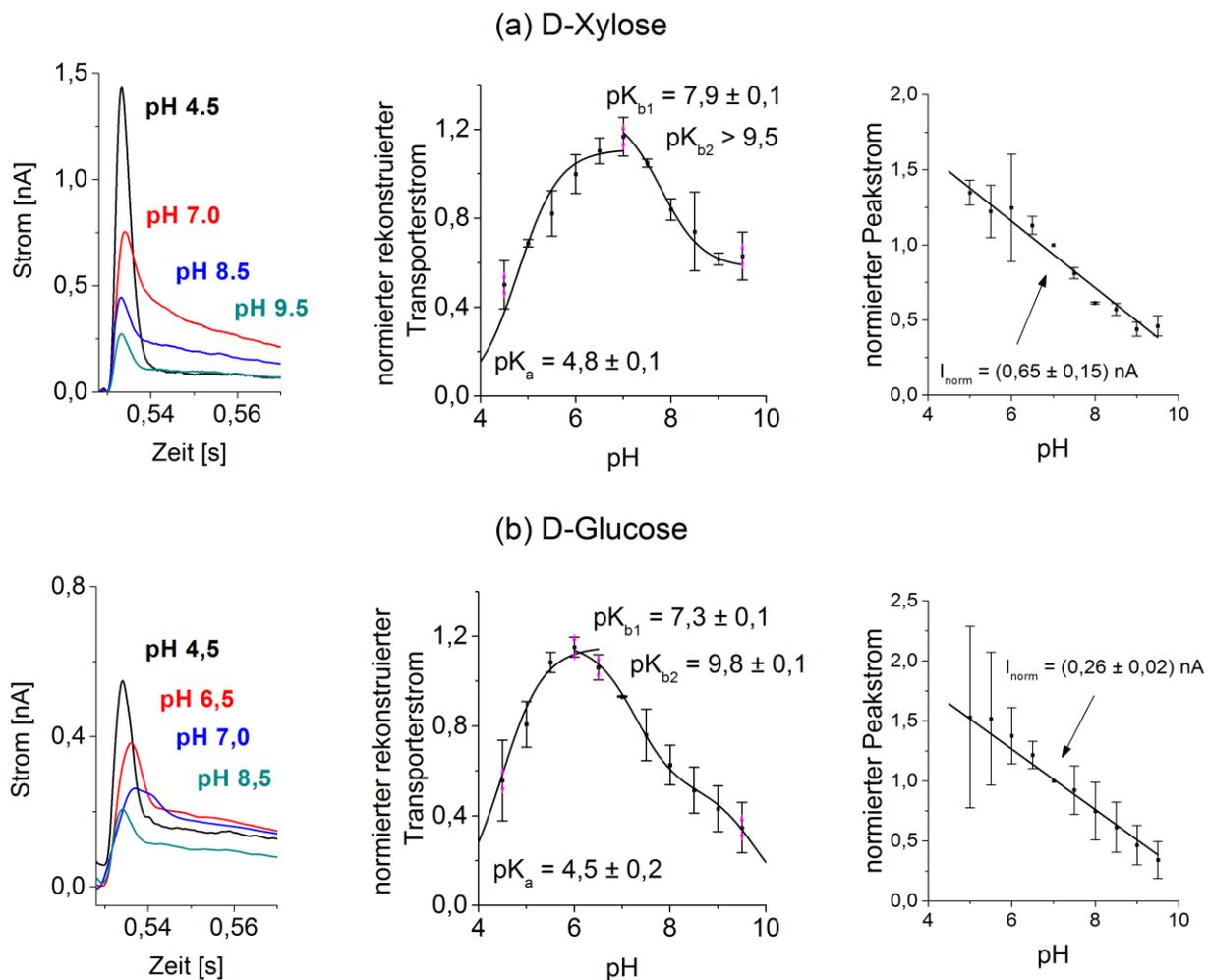
D-Xylose-induzierten Ladungsverschiebung in D27N XylE (Seite 108, Abbildung 37a) und wt XylE (Seite 106, Abbildung 36c). Dies deutet darauf hin, dass in Q175I/L297F XylE der *induced fit* für D-Glucose ähnlich abläuft wie der für D-Xylose in wt XylE. Der Transporter-Zustand von D-Glucose-gebundenem Q175I/L297F XylE zeigt möglicherweise Ähnlichkeiten zum Transporter-Zustand von D-Xylose-gebundenem wt XylE.

**Tabelle 24: Vergleich der KM- und pK-Werte von wt XylE und Q175I/L297F XylE.** Die angegebenen KM-Werte wurden bei pH 7,6 bestimmt. Die KM- und pK-Werte für D-Xylose an wt XylE sind Seite 81, Abbildung 26c bzw. Seite 102, Abbildung 34 entnommen. Die KM-Werte für D-Glucose an wt XylE wurden Seite 81, Abbildung 26b entnommen. Die Fits zur Ermittlung der pK-Werte für D-Glucose an wt und Q175I/L297F XylE sind in Abbildung 49 dargestellt. Die Bestimmung von KM- und pK-Werten erfolgt analog zur Beschreibung auf Seite 53 bzw. Seite 56. Die Graphen zur Bestimmung der KM-Werte für D-Xylose und D-Glucose mit Q175I/L297F XylE sind nicht gezeigt.

XylE Variante	Substrat	KM	pKa-Wert	pKb-Wert	
Q175I/L297F	D-Xylose	1,4 ± 0,6	4,8 ± 0,1	7,9 ± 0,2	> 10
	D-Glucose	1,5 ± 0,8	4,6 ± 0,1	7,3 ± 0,1	9,8 ± 0,2
wt	D-Xylose	1,7 ± 0,2	4,6 ± 0,2	7,7 ± 0,2	10,6 ± 0,1
	D-Glucose	0,4 ± 0,1	4,7 ± 0,1	/	10,4 ± 0,1

Tatsächlich ist neben dem schnellen *pre steady-state* Signal ein langsamer transienter Strom mit niedrigen Amplituden im Bereich von 100 bis 300 pA erkennbar, was sehr gut zu dem beschriebenen Phänotyp von Q175I/L297F XylE passt. Die D-Glucose-induzierten Peakströme der langsamen Komponente in Q175I/L297F XylE entsprechen etwa 10 % des Xylose-induzierten Peakstroms in wt XylE (etwa 2 nA). Genauso zeigt Q175I/L297F XylE im *Counterflow*-Assay mit D-Glucose etwa 10 % des Transports von D-Xylose in wt XylE [144]. In dieser Hinsicht stimmen die Ergebnisse aus den radioaktiven Transportassays sehr genau mit den Ergebnissen auf der SSM überein (Seite 127, Tabelle 23). In Q175I/L297F XylE korreliert der langsame transiente Strom daher sehr wahrscheinlich mit stationärem Transport von D-Glucose. Im Gegensatz dazu zeigt wt XylE wie oben beschrieben im radioaktiven Transportassay keinen D-Glucose-Uptake, aber auf der SSM einen D-Glucose-induzierten Peakstrom von 25 % des Xylose-induzierten *steady-state* Stroms. Dieser Vergleich bestätigt erneut, dass die langsame Komponente des D-Glucose-induzierten Signals in wt XylE keinen *steady-state* repräsentieren kann.

Die pH-Abhängigkeit des D-Glucose induzierten *steady-state* Peakstroms in Q175I/L297F XylE (Abbildung 49) ähnelt stark der pH-Abhängigkeit von D-Xylose in wt XylE (Seite 102, Abbildung 34). Im Gegensatz zur pH-Abhängigkeit von D-Glucose an wt XylE ergeben sich wieder zwei pKb-Werte, die denen der pH-Abhängigkeit von D-Xylose an wt XylE ähneln (Tabelle 24).



**Abbildung 49: pH-Abhängigkeit D-Glucose- und D-Xylose-induzierter Signale von Q175I/L297F XylE.** Alle Ströme wurden am schnellen Setup aufgenommen. Links sind jeweils repräsentative transiente Ströme dargestellt. In der Mitte sind die normierten, gemittelten und rekonstruierten Transporterströme dargestellt. Die Rekonstruktion erfolgte mit Gleichung G48 (Seite 59). Die pH-Abhängigkeiten des rekonstruierten Transporterstroms wurden mittels Titrationsgleichung in den entsprechend angegebenen Intervallen (pink) gefittet (Seite 57, Gleichungen G40 bzw. G42). Q175I/L297F XylE zeigt in radioaktiven Transportassays langsamen Glucose-Uptake [144]. Hier ist die langsame Komponente also im Gegensatz zu der in wt XylE (Seite 129, Abbildung 47) dem steady-state zuzuordnen. Rechts sind die von der pre steady-state Komponente definierten Peakströme gezeigt. Die pH-Abhängigkeit der Peakströme wurde auf den Peakstrom bei pH 7 normiert, gemittelt und mittels linearer Regression gefittet. Die schnelle pre steady-state Komponente zeigt für D-Xylose eine ähnliche pH-Abhängigkeit wie D27N XylE (Seite 108, Abbildung 37b) und wt XylE in extremen pH-Bereichen (Seite 109, Tabelle 21). Für D-Glucose ist die Amplitude der pre steady-state Komponente in Q175I/L297F XylE im Vergleich zu D27N XylE (Seite 130, Abbildung 48) erhöht.

Der KM-Wert ist für den Transport von D-Glucose und D-Xylose durch Q175I/L297F XylE identisch und gleich dem KM-Wert für den Xylose-Transport in wt XylE. Damit hat sich der KM-Wert von D-Glucose durch die Mutation signifikant erhöht. Der auf der SSM für D-Glucose mit wt XylE bestimmte KM-Wert (0,4 mM) stimmt gut mit dem in der Literatur veröffentlichten KD-Wert von 0,77 mM [132] überein, weshalb der KM-Wert sehr wahrscheinlich mit der Affinität gleichgesetzt werden kann. Korrelieren die KM-Werte mit den Affinitäten, so ließen sich die Unterschiede zwischen D-Glucose und D-Xylose molekular erklären. Im Gegensatz zu D-Xylose besitzt D-Glucose eine zusätzliche C6OH-Gruppe. Diese wird durch Wasserstoffbrücken mit Q175 und Q168 in wt XylE

gebunden [132], weshalb die Affinität zu Glucose im wt (0,4 mM) im Vergleich zu Xylose (1,7 mM) erhöht ist (Tabelle 24). Die in Q175I/L297F XylE mutierten Reste sind ebenfalls in der Nähe der C6OH Gruppe lokalisiert: Q175 bildet die Wasserstoffbrücke zur C6OH-Gruppe, während L297 etwa 3,5 Å vom C6-Rest entfernt lokalisiert ist. Durch Einführen der Mutationen wurde die stabilisierende Wasserstoffbrücke entfernt und zugleich mit 297F eine sterische Hinderung für C6OH eingeführt [144]. Damit verbunden ist auch ein reduzierter KM-Wert für Glucose in Q175I/L297F XylE (1,5 mM) im Vergleich zu wt XylE (0,4 mM).

## Kinetische Simulationen

Kinetische Simulationen helfen dabei ein Transportmodell zu entwickeln, das die experimentellen Daten der verschiedenen Transporter beschreibt. Es soll untersucht werden, ob ein allgemeingültiges Modell für alle PMF-gekoppelten Symporter formuliert werden kann. Dabei wurde das 6-Zustands-Modell zugrunde gelegt (Seite 61, Abbildung 18) und zunächst die sinnvollste Integration der Detailed Balance Bedingung auf Basis vorhandener Daten für LacY überprüft (Seite 136, Tabelle 25). Diese muss berücksichtigt werden, da die Transporter asymmetrische pK-Werte aufweisen. Im Anschluss wurden vergleichende Simulationen der Umsatzraten (pH- und Substrat-Abhängigkeiten) für LacY, FucP und XylE durchgeführt und die erhaltenen apparenten Konstanten (pK-Werte, KM-Werte) mit den experimentell bestimmten Konstanten verglichen (Seite 139, Tabelle 26). Zuletzt wurde das MKM für die drei Transporter unter *in vivo* Bedingungen, also mit Membranpotential, simuliert (Seite 145, Abbildung 53). So können die unter *in vivo* Bedingungen sinnvollsten apparenten pK-Werte abgeleitet und mit den gemessenen sowie simulierten pK-Werten verglichen werden.

### Detailed Balance Kinetik

Die pH-Abhängigkeiten der *E.coli* Transporter deuten darauf hin, dass im Zuge des Transportzyklus eine pK-Verschiebung – oder auch pK-switch – stattfinden könnte (Seite 102, Abbildung 34). Eine pK-Verschiebung bedeutet konkret, dass sich die Affinität für Protonen im Zuge des Transportzyklus ändert. Ein hochaffiner Aufnahme-pK müsste durch Energieverbrauch in einen niederaffinen Abgabe-pK umgewandelt werden. Dabei sind für eine Verschiebung von  $\Delta pK = 1$  etwa 5,7 kJ/mol Energie erforderlich (Gleichung G60), was die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante  $k$  der pK-switch-Reaktion nach Arrhenius um genau eine Größenordnung verlangsamt (Gleichung G61).

$$\Delta G^0 = -RT \ln 10^{\Delta pK} \approx 5,7 \text{ kJ/mol für } \Delta pK = 1 \quad \text{G60}$$

$$k = A \cdot e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}} = A \cdot 0,1 \quad \text{G61}$$

Da je nach Richtung der pK-Verschiebung Energie benötigt oder frei wird, ergibt sich automatisch eine Asymmetrie von Vorwärts- und Rückwärtsrate der pK-*switch*-Reaktion. Dies muss im MKM durch die *Detailed Balance* Bedingung berücksichtigt werden. Es handelt sich um die direkte Konsequenz der Energieerhaltung für die Kinetik unter Gleichgewichtsbedingungen [269–273]. Für einen Reaktionszyklus von reversiblen Folgereaktionen muss das Produkt der Geschwindigkeiten aller Vorwärtsreaktionen gleich dem Produkt der Geschwindigkeiten aller Rückwärtsreaktionen sein. Wenn also die Ratenkonstanten einer reversiblen Reaktion asymmetrisch sind (z.B.  $k_f > k_r$ ), so müssen die Ratenkonstanten einer anderen reversiblen Reaktion im Reaktionszyklus die umgekehrte Asymmetrie aufweisen (z.B.  $j_f < j_r$ ). Die asymmetrischen pK-Werte erfordern demnach das Einführen einer weiteren asymmetrischen Reaktion.

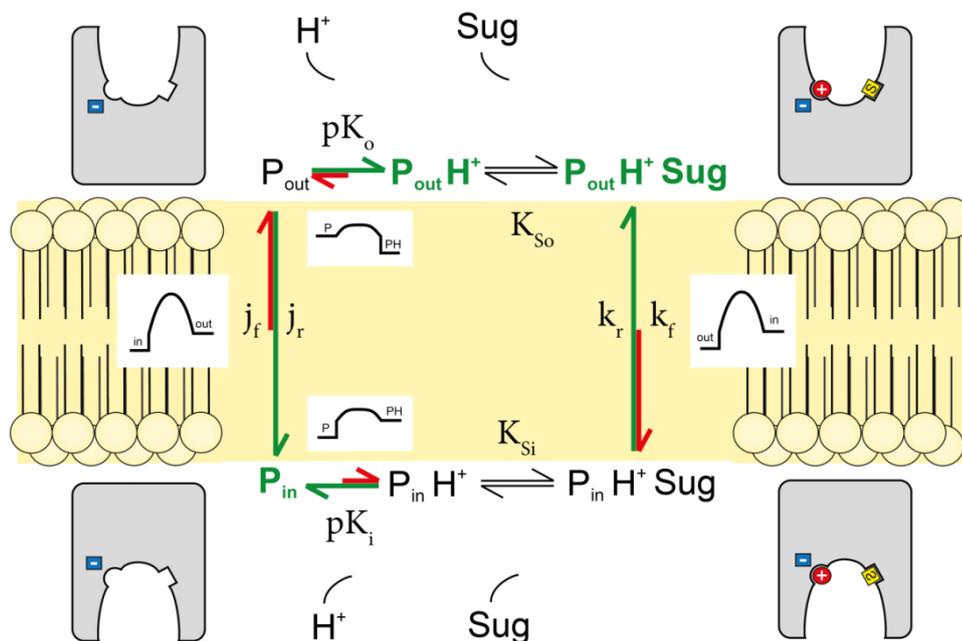
Nun muss geklärt werden welche Reaktion im MKM die pK-Verschiebung bewirkt und daher asymmetrische Ratenkonstanten aufweisen muss. Es gibt prinzipiell mehrere Möglichkeiten im vorliegenden 6-Zustands-Modell die *Detailed Balance* zu berücksichtigen.

- (1) Durch eine entgegengesetzte Asymmetrie der KD-Werte, also einer niedrigen Affinität im auswärtsgerichteten Zustand und einer hohen Affinität im einwärtsgerichteten Zustand. Diese Möglichkeit kann ausgeschlossen werden, da für LacY die KD-Werte in *iso*- und *rso*-Vesikeln identisch sind [170].
- (2) Durch asymmetrische Ratenkonstanten für die Konformationsänderung des leeren Carriers. Hier wurden für das Öffnen und Schließen der Kavitäten lediglich Werte für  $k_{obs}$  (ca.  $50 \text{ s}^{-1}$ ) bestimmt, sodass die tatsächlichen Ratenkonstanten ( $j_f$  und  $j_r$ ) unbekannt sind [165–167].
- (3) Durch asymmetrische Ratenkonstanten für die Konformationsänderung des beladenen Carriers. Hier zeigt die Simulation elektrophysiologischer Daten in einem 4-Zustands-Modell, dass die Ratenkonstante der Konformationsänderungen mit  $k_f = 250 \text{ s}^{-1}$  angenommen werden kann [163].

Die Simulationen von Garcia-Celma et al. zeigen, dass auch der experimentell bestimmte  $k_{obs}$ -Wert für die Konformationsänderungen des leeren Carriers als Vorwärtsrate interpretiert werden kann. Aus diesem Grund könnte die Rückwärtsrate der jeweiligen Konformationsänderung entsprechend der *Detailed Balance* Bedingung erhöht werden, während die entsprechende Vorwärtsrate auf den experimentell bestimmten Wert festgelegt ist. Die *Detailed Balance* Bedingung lässt sich ebenso auf die Rückwärtsraten der beiden Konformationsänderungen verteilen, was schematisch in [Abbildung 50](#) dargestellt ist. Für eine pK-Verschiebung mit  $\Delta pK = 2$  würden dann beide Rückwärtsraten um eine Größenordnung beschleunigt werden: Während der Konformationsänderung des beladenen Carriers von der auswärtsgerichteten in die einwärtsgerichtete Konformation wird das Energieniveau des protonierten Zustands angehoben. Dadurch wird die entsprechende Vorwärtsrate der

Konformationsänderung verlangsamt, aber das Gleichgewicht der nachfolgenden Protonenfreisetzung in Richtung unprotoniertem Carrier verschoben (pK<sub>i</sub>-Wert liegt im sauren pH-Bereich). Während der Konformationsänderung des leeren Carriers wird das Energieniveau im unprotonierten Carrier angehoben, was die Vorwärtsrate der Konformationsänderung verlangsamt, aber das Gleichgewicht der nachfolgenden Protonierung in Richtung protonierten Carrier verschiebt (pK<sub>o</sub>-Wert liegt im basischen pH-Bereich).

In diesem Modell sind die energetisch günstigsten Zustände (unter Vernachlässigung der Zuckerbindungsreaktion) der einwärtsgerichtete unprotonierte sowie der auswärtsgerichtete protonierte Zustand. Die *Detailed Balance* stellt sicher, dass nach einem Reaktionszyklus wieder dasselbe Energieniveau erreicht wird.



**Abbildung 50: 6-Zustands-Modell unter Berücksichtigung topologisch asymmetrischer pK-Werte und der *Detailed Balance* Bedingung.** Die *Detailed Balance* Bedingung ist durch Anwendung auf die Ratenkonstanten beider Konformationsänderungen berücksichtigt (*Seite 62, Tabelle 9, BLC*). Die asymmetrischen pK-Werte begünstigen den Influx-Modus, d.h. die Protonierung außen (hoher pK<sub>o</sub>-Wert) und die Deprotonierung innen (niedriger pK<sub>i</sub>-Wert). Aufgrund der *Detailed Balance* müssen die Ratenkonstanten der Konformationsänderungen deshalb so asymmetrisch eingestellt werden, dass der Influx gegenüber dem Efflux benachteiligt ist. Grüne und rote Reaktionspfeile symbolisieren hohe bzw. niedrige Ratenkonstanten. Die Asymmetrie der Ratenkonstanten geht mit einer Energiedifferenz zwischen Edukt und Produkt einher. Die *Detailed Balance* Bedingung bewirkt, dass nach einem Reaktionszyklus dasselbe Energieniveau erreicht wird, wie zu Beginn des Reaktionszyklus. In diesem Modell sind (unter Vernachlässigung der Zuckerbindungsreaktion) der unprotonierte einwärtsgerichtete und der protonierte auswärtsgerichtete Carrier die energetisch günstigsten Zustände (grün markiert).

### **Simulation mit *Detailed Balance* Bedingung**

Die Parameter im MKM (KD, pK<sub>o</sub>, pK<sub>i</sub>, k, j, cs, pH) werden auf Basis verschiedener experimenteller Evidenzen für LacY entsprechend eingestellt, um die Umsatzrate U und apparenten Konstanten (pK<sub>a</sub>, pK<sub>b</sub>, KM) zu simulieren und mit den experimentellen Daten zu vergleichen. Die Ratenkonstanten der Vorwärtsreaktionen dieser Konformationsänderungen werden mit j<sub>f</sub> = 50 s<sup>-1</sup> und k<sub>f</sub> = 250 s<sup>-1</sup> für die

Konformationsänderung des leeren bzw. des beladenen Carriers angenommen (Seite 25f). Die KS-Werte werden gleich der experimentell ermittelten KD-Werte gesetzt. Als Zuckerkonzentrationen werden in das Modell die im Experiment verwendeten Konzentrationen eingesetzt. Das Membranpotential wird zum Zeitpunkt des Peakstroms im SSM-Experiment mit 0 V angenommen.

Die Detailed Balance Bedingung kann im MKM in drei verschiedenen Szenarien erfüllt werden (siehe oben), indem die Rückwärtsraten der Konformationen des beladenen Carriers (BC), des leeren Carriers (LC) oder des beladenen und des leeren Carriers (BLC) entsprechend des Detailed Balance Faktors R erhöht werden (Seite 62, Tabelle 9). Die Ergebnisse der Simulationen in diesen drei Szenarien wurden für LacY in Tabelle 25 den experimentell gefundenen Daten gegenübergestellt.

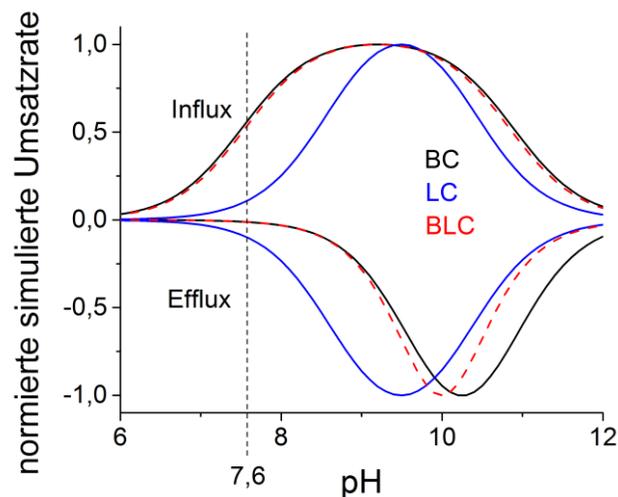
**Tabelle 25: Vergleich der Ergebnisse aus Simulationen im MKM für LacY mit unterschiedlicher Berücksichtigung der Detailed Balance Bedingung.** In allen Fällen wurden die Rückwärtsraten der Konformationsänderungen (kr bzw. jr) über den Detailed Balance Faktor R erhöht. Im BC-Szenarium wurden die Rückwärtsrate der Konformationsänderung des beladenen Carriers (BC) erhöht. Im LC-Szenarium wurde die Rückwärtsrate der Konformationsänderung des leeren Carriers (LC) erhöht. Im BLC-Szenarium wurden die Rückwärtsraten beider Konformationsänderungen erhöht. Die Gleichungen für R und kr bzw. jr für die drei verschiedenen Szenarien sind Seite 62, Tabelle 9 zu entnehmen. Rot markiert sind simulierte Parameter, die eine hohe Abweichung von den experimentellen Daten zeigen. Das BLC-Szenarium wird aufgrund des großen Detailed Balance Faktors und der simulierten pK-Werte (blau) ausgeschlossen. Grün hinterlegt sind experimentelle Daten für den Zuckergradienten-getriebenen Transport von D-Lactose durch wt LacY. 1: aus Garcia-Celma et al. [205], 2: aus Viitanen et al. [89], 3: aus Kaczorowski et al. [162].

	R	sim. pKi	sim. pKo		app. pKa	app. pKb	pH Optimum	vmax pH Opt.	vmax pH 7,6	KM pH 7,6
BC	126	7,6	9,7	Influx	7,5	10,9	9,2	39 s <sup>-1</sup>	22 s <sup>-1</sup>	1,7 mM
				Efflux	9,4	11,1	10,3	31 s <sup>-1</sup>	0,4 s <sup>-1</sup>	35 μM
LC	32	9,5	11	Influx	8,5	10,6	9,5	25 s <sup>-1</sup>	3 s <sup>-1</sup>	2,5 mM
				Efflux	8,5	10,6	9,5	28 s <sup>-1</sup>	3 s <sup>-1</sup>	2,5 mM
BLC	1.600	8,4	11,6	Influx	7,5	10,9	9,2	34 s <sup>-1</sup>	19 s <sup>-1</sup>	8 mM
				Efflux	9,3	10,7	10,0	78 s <sup>-1</sup>	1 s <sup>-1</sup>	0,4 mM
Exp.				Influx	7,5	10,9	9,5	/	/	5,3 mM <sup>1</sup>
				Efflux	8,5 <sup>2</sup>	/	10,0 <sup>2</sup>	50 s <sup>-1,2,3</sup>	8 s <sup>-1,3</sup>	2,5 mM <sup>3</sup>

Die pKo- und pKi-Werte wurden bestimmt, indem die pH-Abhängigkeit der Umsatzrate entsprechend der experimentell bestimmten pH-Abhängigkeit (pKa = 7,5, pKb = 10,9, pH-Optimum ~ 9,5) für den Influx-Modus (cso = 0,1 M, csi = 0 M) eingestellt wird. Die Werte für den Efflux wurden dann aus der pH-Abhängigkeit der Umsatzrate mit umgekehrten Zuckergradienten (cso = 0 M, csi = 0,1 M) generiert. Die pK-Werte im einwärtsgerichteten und auswärtsgerichteten Zustand erhöhen jeweils durch die günstiger liegenden Bindungsgleichgewichte die Umsatzrate im Influx gegenüber der im Efflux. Umgekehrt erhöhen die relativ zu den Vorwärtsraten erhöhten Rückwärtsraten der Konformationsänderungen die Umsatzrate im Efflux gegenüber der im Influx. In den Simulationen heben sich diese Effekte gegenseitig auf, sodass am pH-Optimum in allen Szenarien ähnliche Umsatzraten für Influx und Efflux erreicht werden.

In den Szenarien BC und BLC unterscheiden sich die pH-Optima im Influx und Efflux. Für den Influx bestimmt der  $pK_a$ -Wert (7,5) das vorgelagerte Gleichgewicht für die ratenlimitierende Konformationsänderung des leeren Carriers. Das pH-Optimum liegt in der Simulation bei pH 9,2. Für den Efflux definiert allerdings der  $pK_b$ -Wert (10,9) das vorgelagerte Gleichgewicht des leeren Carriers, weshalb das pH-Profil im Vergleich zum Influx schmaler und das pH-Optimum zum Basischen hin verschoben ist (*Abbildung 51, rote und schwarze Kurve*). Die Umsatzrate fällt im Efflux im physiologischen pH-Bereich auf unter  $1\text{ s}^{-1}$  und unterscheidet sich so signifikant von der Umsatzrate im Influx-Modus ( $22\text{ s}^{-1}$ ). Im physiologischen pH-Bereich ist daher der Influx begünstigt.

Im LC-Szenarium ergibt sich zwar ein hinsichtlich Influx und Efflux symmetrischer Transporter. Das pH-Profil ist allerdings unabhängig von den  $pK$ -Werten sehr schmal, sodass die experimentell bestimmten  $pK$ -Werte nicht eingestellt werden können (*Abbildung 51, blaue Kurve*). Stattdessen wurde in der Simulation das experimentell bestimmte pH-Optimum abgebildet. Insbesondere für die größte detektierte apparente  $pK$ -Verschiebung in Xyle liefert das LC-Szenarium keine gute Näherung.



**Abbildung 51. Simulierte pH-Profile für Influx und Efflux im MKM mit unterschiedlicher Berücksichtigung der *Detailed Balance* Bedingung.** Für die Simulation des Influx wurde  $c_{so} = 0,1\text{ M}$  und  $c_{si} = 0\text{ M}$ , für die Simulation des Efflux  $c_{so} = 0\text{ M}$  und  $c_{si} = 0,1\text{ M}$  festgelegt. Charakteristische Parameter ( $pK$ - und  $KM$ -Werte) der Simulationen und weitere Details sind [Tabelle 25](#) zu entnehmen.

Ein Vergleich zwischen BC- und BLC-Szenarium zeigt vor allem Unterschiede in den  $KM$ -Werten und den simulierten, tatsächlichen  $pK_i$ - und  $pK_o$ -Werten. Die  $KM$ -Werte sind vor allem im BC-Szenarium hinsichtlich Influx und Efflux sehr asymmetrisch, was den experimentellen Daten widerspricht. Für den Influx-Modus liegt der simulierte  $KM$ -Wert in beiden Fällen jedoch nahe an dem experimentell bestimmten  $KM$ -Wert. Der  $pK$ -switch fällt im BLC-Szenarium um eine  $pH$ -Einheit größer aus. Zudem sind die tatsächlichen  $pK_i$ - und  $pK_o$ -Werte im BLC-Szenarium (8,4 bzw. 11,6) gegenüber denen im BC-Szenarium (7,6 bzw. 9,7) weit ins Basische verschoben.

Es ist festzuhalten, dass keine Anwendung der *Detailed Balance* Kinetik im Rahmen des MKM zu Ergebnissen führt, die mit allen experimentellen Daten kompatibel sind. Dass keiner der drei Szenarien die experimentellen Daten korrekt wiedergibt, zeigt bereits die Grenzen des MKM auf.

Das MKM im BC-Szenarium eignet sich gut zur Simulation der experimentellen Ergebnisse im Influx-Modus, solange das Modell nicht auf seine Symmetrie hin getestet wird. Zudem bestätigen empirische pK-Kalkulationen, dass die apparenten pK<sub>b</sub>-Werte stärker von den tatsächlichen pK<sub>o</sub>-Werten abweichen als die pK<sub>a</sub>-Werte von den pK<sub>i</sub>-Werten. Dies ist im BC-Szenarium, nicht aber im BLC-Szenarium gegeben (*Seite A3, Tabelle 31*). Das BC-Szenarium hat einen weiteren Vorteil gegenüber den anderen Szenarien: Es integriert direkt eine Erklärung für den Mechanismus der pK-Verschiebung. So wird im BC-Szenarium der pK-switch über die Bindung des Zuckermoleküls induziert. Im Folgenden wird für die vergleichenden Simulationen im MKM daher die *Detailed Balance* Bedingung auf die Rückwärtsrate der Konformationsänderung des beladenen Carriers angewendet.

Eine Diskrepanz zwischen experimentellen Daten und im BC-Szenarium simulierten Parametern ist jedoch noch hervorzuheben. Die Simulation im BC-Szenarium ergibt einen pK<sub>o</sub>-Wert (9,7), der unterhalb des apparenten pK<sub>b</sub>-Wertes (10,9) liegt. Der in der Literatur veröffentlichte pK-Wert der Zuckerbindung (> 10,5) [*164, 176, 177*] wird jedoch als tatsächlicher pK<sub>o</sub>-Wert betrachtet. Falls das BC-Szenarium die Realität widerspiegelt, müsste der pK-Wert der Zuckerbindung apparent interpretiert werden. Wird der pK-Wert der Zuckerbindung allerdings als pK<sub>o</sub>-Wert interpretiert, wären diese Ergebnisse eher mit dem LC-Szenarium (pK<sub>o</sub> = 11) kompatibel, das aufgrund des schmalen pH-Profiles ausgeschlossen wurde.

## Vergleichende Simulationen für LacY, FucP und Xyle

Auf Basis der experimentell bestimmten Parameter soll die allgemeine Gültigkeit des MKM (*Seite 61, Abbildung 18*) für die Transporter LacY, FucP und Xyle überprüft werden. Dabei wird die *Detailed Balance* Bedingung entsprechend der Überlegungen im vorangehenden Abschnitt durch Erhöhung der Rückwärtsrate der Konformationsänderung des beladenen Carriers erfüllt (BC-Szenarium, *Seite 136, Tabelle 25*).

Die Ratenkonstanten für die Konformationsänderung des beladenen und leeren Carriers werden für alle Transporter auf Basis experimenteller Evidenzen für LacY auf 50 s<sup>-1</sup> bzw. 250 s<sup>-1</sup> festgelegt (*Seite 25f*). Dass diese Ratenkonstanten in den drei *E.coli* Transportern sehr ähnlich sind, ist demnach Grundannahme für die Simulationen.

### Simulation der pK-Werte

Zunächst wird die pH-Abhängigkeit simuliert. Es werden die pKi- und pKo-Werte so eingestellt, dass sich eine pH-Abhängigkeit der Umsatzrate ergibt, wie sie im SSM-Experiment für den jeweiligen Transporter detektiert wurde (*Seite 102, Abbildung 34*). Mit den verwendeten Ratenkonstanten für die Konformationsänderungen ergibt sich für alle Transporter am pH-Optimum eine maximale Umsatzrate von etwa  $40 \text{ s}^{-1}$ , die mit den in der Literatur angegebenen Umsatzraten von LacY übereinstimmt [73, 162].

In *Tabelle 26* sind die aus dem SSM-Experiment erhaltenen apparenten pKa- und pKb-Werte den so simulierten pKi- und pKo-Werten für alle drei *E.coli* Transporter gegenübergestellt. Es ist im Rahmen des MKMs unter Berücksichtigung der *Detailed Balance* Bedingung nicht möglich die pKo/pKi-Werte symmetrisch einzustellen und gleichzeitig die apparent asymmetrischen pKb/pKa-Werte zu simulieren. Dennoch wird deutlich, dass die Differenz der realen pK-Werte signifikant niedriger ist als die Differenz der apparenten pK-Werte. Die tatsächliche pK-Verschiebung im Zuge des Transportzyklus ist damit kleiner als die apparenten pK-Werte andeuten. In der durchgeführten Simulation zeigt nur der pKo-Wert eine signifikante Abweichung vom apparenten pKb-Wert; der pKi-Wert hingegen entspricht dem apparenten pKa-Wert. Dies ist jedoch vor allem dadurch bedingt, dass die *Detailed Balance* Bedingung im MKM im BC-Szenarium erfüllt ist (*Seite 136, Tabelle 25*).

**Tabelle 26: Gegenüberstellung der apparenten pKa- und pKb-Werte aus dem SSM-Experiment und der realen pKi- und pKo-Werte aus der Simulation im MKM.** Rot hinterlegt sind experimentelle (Exp.) Parameter; grün hinterlegt sind simulierte (Sim.) Parameter. Für die Simulation wurden die gemessenen apparenten pK-Werte (*Seite 103, Tabelle 19*), die gemessenen KD-Werte (*Seite 87, Tabelle 16*) sowie die Ratenkonstanten für die Konformationsänderungen ( $k_f = 250 \text{ s}^{-1}$ ,  $j_f = j_r 50 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_r = k_f \cdot R$  mit dem *Detailed Balance* Faktor R; *Seite 62, Tabelle 9*, BC-Szenarium) verwendet. 1: Nach Garcia-Celma et al. [205] 2: Nach Smirnova et al. [164] 3: Für FucP ist der KD-Wert im SSM-Experiment nicht zugänglich. In der Literatur wurden KD-Werte für FucP und XylE mittels ITC-Messungen bestimmt und liegen in derselben Größenordnung [131, 132]. Aus diesem Grund wird für FucP derselbe KD-Wert wie für XylE angenommen.

		KS	pKa	pKb	kr	pH Opt.	KM pH 7,6	KM pH 10,6
			pKi	pKo				
LacY	Exp.	20 mM	7,5 ± 0,2	10,9 ± 0,1	31.000	9,6	5,3 mM <sup>1</sup>	35 mM <sup>2</sup>
	Sim.		7,6	9,7		9,2	1,8 mM	5,5 mM
FucP	Exp.	1 mM <sup>3</sup>	6,3 ± 0,2	9,4 ± 0,1	2.500	8,4	0,9 mM	/
	Sim.		6,4	7,4		7,8	0,7 mM	530 mM
XylE	Exp.	1 mM	4,6 ± 0,2	10,6 ± 0,1	2.000.000	6,9	1,7 mM	5,8 mM
	Sim.		4,7	8,6		7,6	0,2 mM	33 mM

### Simulation der KM-Werte

Die ermittelten pKo- und pKi-Werte können nun dazu verwendet werden die Abhängigkeit der Umsatzrate von der Zuckerkonzentration für verschiedene pH-Werte zu simulieren. Hieraus ergibt sich die pH-Abhängigkeit der KM-Werte, die mit den experimentellen Daten verglichen werden kann.

Wie im Experiment steigt der simulierte KM-Wert mit dem pH-Wert an ([Tabelle 26](#)). Die simulierten KM-Werte zeigen jedoch eine wesentlich stärkere Abhängigkeit vom pH-Wert als die experimentellen Werte ([Seite 82, Tabelle 14](#)). Der experimentell bestimmte KM-Wert für D-Xylose an XylE erhöht sich zwischen pH 7,6 und pH 10,6 um einen Faktor 3. Dagegen fordert das MKM eine Erhöhung des KM-Wertes um mehr als zwei Größenordnungen, damit die Umsatzrate mit einem pK<sub>b</sub>-Wert von 10,6 inhibiert wird. In der Simulation beeinflusst das Protonierungs-Gleichgewicht ausschließlich über die KM-Erhöhung die pH-Abhängigkeit der Umsatzrate im basischen pH-Bereich ([Seite 58, Gleichung G45](#)). Das Experiment zeigt jedoch, dass der pH-Wert einen direkten Einfluss auf den v<sub>max</sub>-Wert haben muss. Dies geht bereits aus der gemessenen pH-Abhängigkeit hervor ([Seite 102, Abbildung 34](#)). Hier wurden für alle pH-Werte sättigende Zuckerkonzentrationen verwendet. Dennoch wird eine Inhibition des Transporterstroms im Basischen mit dem entsprechenden pK<sub>b</sub>-Wert beobachtet.

### ***Rückwärtsraten des beladenen Carriers***

Dass die *Detailed Balance* Bedingung im gewählten Modell nur über die Erhöhung der Rückwärtsrate der Konformationsänderung des beladenen Carriers erfüllt ist, geht mit einem weiteren Problem einher. Die entsprechenden Ratenkonstanten ( $k_r$ ) nehmen extrem hohe Werte an. Je weiter die realen pK-Werte beider Konformationen auseinander liegen, desto größer wird die Ratenkonstante der Rückwärtsreaktion des beladenen Carriers. Für FucP ( $\Delta pK = 1,0$ ) und LacY ( $\Delta pK = 1,9$ ) liegen  $k_r$  bei  $2.500 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $20.000 \text{ s}^{-1}$ . Für XylE ( $\Delta pK = 3,9$ ) ergibt sich jedoch eine extreme Ratenkonstante von über  $10^6 \text{ s}^{-1}$ , die für eine globale Konformationsänderung unglaublich erscheint. Und das, obwohl die simulierte pK-Verschiebung im gewählten Modell bereits signifikant niedriger ausfällt als die apparente ([Seite 136, Tabelle 25, BC-Szenarium](#)). Andererseits ist anzumerken, dass XylE sich von LacY und FucP unterscheidet, weil die Inhibition des Transporterstroms mit zwei pK<sub>b</sub>-Werten beschrieben werden muss. In der Simulation hingegen ist nur der pK<sub>b</sub>-Wert der Zuckerbindung berücksichtigt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass für XylE möglicherweise ein komplexeres Modell erforderlich ist.

Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass die hohe Asymmetrie zwischen Vorwärts- und Rückwärtsraten kein Problem darstellt. Typische Aktivierungsenergien für Reaktionen in Lösung liegen im Bereich von 50 kJ/mol [[274](#)]. Werden die Ratenkonstanten einer solchen Reaktion asymmetrisch, sodass sich  $k_r$  und  $k_f$  um einen Faktor 10 unterscheiden, ändert sich die Aktivierungsenergie für Vorwärts- oder Rückwärtsreaktion nur um etwa 10 % (5,7 kJ/mol; [Seite 133, Gleichungen G60 und G61](#)).

Es ist auch anzumerken, dass die Unterschiede in den apparenten pK-Verschiebungen der drei Transporter prinzipiell auch durch von LacY abweichende Ratenkonstanten der Konformationsänderungen bedingt sein könnten, und nicht ausschließlich durch Unterschiede in  $k_r$ .

## Die optimalen pKi- und pKo-Werte unter *in vivo* Bedingungen

Die pKi- und pKo-Werte der *E.coli* Transporter unterscheiden sich erheblich voneinander, obwohl sie *in vivo* denselben äußeren Bedingungen ausgesetzt sind. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, welchen Einfluss verschiedene pK-Werte auf die Umsatzrate eines Transporters *in vivo* haben. Es ist anzunehmen, dass sich durch die Variation der pK-Werte in LacY, FucP und XylE im beobachteten Rahmen ( $4,7 < pKi < 7,5$  und  $7,4 < pKo < 9,7$ ; [Seite 139, Tabelle 26](#)) keine Nachteile für den Organismus ergeben. Die Umsatzrate sollte demnach für alle beobachteten pK-Werte zumindest nahe der maximal möglichen Umsatzrate liegen. Dies soll hier überprüft werden, indem im MKM die Abhängigkeit der Umsatzrate von den pKi- und pKo-Werten simuliert wird. Dazu werden äußere Bedingungen angenommen, wie sie *in vivo* vorherrschen.

### **Die äußeren Gegebenheiten in vivo**

LacY, FucP und XylE kommen nativ in dem Enterobakterium *Escherichia coli* vor. Es ist in seiner natürlichen Umgebung verschiedensten pH-Bedingungen ausgesetzt und in der Lage sowohl im extrem sauren Mageninhalt (pH 1,5) als auch in basischer Umgebung am Beginn des Darms (pH 9) zu überleben [\[258\]](#), wobei die pH-Werte im Darm meist zwischen pH 5 und pH 7,5 schwanken [\[174, 175\]](#). Dabei hält es den internen pH-Wert zwischen 7,4 und 7,8 konstant [\[85, 268, 275\]](#). Für die pH-Werte werden daher  $pHi = 7,6$  und  $5 < pHo < 9$  gewählt. Im Darm eines gesunden Menschen herrschen Glucose-Konzentrationen zwischen 200  $\mu$ M und 48 mM [\[276\]](#). Zuckerkonzentrationen in menschlichen Fäkalien variieren zwischen 40 mM und 200 mM [\[277\]](#). Die Konzentrationen von Lactose [\[278\]](#), Fucose und Xylose sind wahrscheinlich geringer als die von Glucose, sodass in den Simulationen von  $cso = 1$  mM als Durchschnittswert für alle Zucker ausgegangen wird. Intrazellulär wird die Zuckerkonzentration  $csi$  nahe null angenommen, da die Zucker unmittelbar nach Aufnahme dem Energiestoffwechsel der Zelle zugeführt werden. Das Membranpotential für *E.coli* variiert zwischen ca. -100 mV und -160 mV [\[279\]](#). Als Triebkräfte für den Zuckertransport fungieren damit das Membranpotential und ein vorhandener Zuckergradient. Der pH-Gradient kann je nach Umgebung treibend oder inhibierend auf den Transport wirken. Die für die Simulationen gewählten Bedingungen sind in [Tabelle 27](#) zusammengefasst.

### **Parameter und Potential-Abhängigkeit**

Die in den Simulationen verwendeten Parameter und die Berechnungen für die Potential-Abhängigkeit sind in [Tabelle 10 \(Seite 62\)](#) gelistet. Um den Mittelwert aller drei Transporter abzubilden, wird in der Simulation 2 mM als KS-Wert verwendet. Die Ratenkonstanten für die Konformationsänderungen werden mit  $j_{r0} = j_{f0} = 50$  s<sup>-1</sup> und  $k_f = 250$  s<sup>-1</sup> gewählt. Die Rückwärtsrate  $k_r$  wird über den *Detailed Balance* Faktor R berechnet. Als elektrogener und somit Potential-abhängiger Schritt wird die Konformationsänderung des leeren Carriers angenommen. Damit wird durch das

anliegende Membranpotential die Ratenkonstante  $j_f$  erhöht und die Ratenkonstante  $j_r$  reduziert. Für ein Membranpotential von  $U_m = -0,1 \text{ V}$  ergibt sich eine effektive Rate für die Vorwärtsreaktion der Konformationsänderung des leeren Carriers von  $j_f = 364 \text{ s}^{-1}$ . Damit wird unter Einfluss eines Membranpotentials die Konformationsänderung des beladenen Carriers ( $250 \text{ s}^{-1}$ ) ratenlimitierend im *steady-state*, was mit experimentellen Ergebnissen für LacY übereinstimmt. Eine ausführlichere Betrachtung hierzu findet sich auf [Seite 25f](#).

**Tabelle 27: Vergleich der Parameter *in vivo* und der für die Simulation der Umsatzrate verwendeten Parameter.** Die angegebenen Bereiche für die Parameter *in vivo* wurden aus der Literatur entnommen. Die entsprechenden Referenzen sind im Haupttext angegeben. Insgesamt wurden Simulationen in sechs verschiedenen Umgebungen durchgeführt. In [Abbildung 52a](#) sind die Ergebnisse der Simulationen bei symmetrischen pH-Werten und Zuckerkonzentrationen dargestellt, sodass nur das Membranpotential als Triebkraft fungiert. [Abbildung 52b](#) zeigt die Ergebnisse, wenn ein Zuckergradient als zusätzliche Triebkraft gewählt wird. In [Abbildung 53](#) werden sowohl mit als auch ohne Zuckergradient die Einflüsse eines extrem sauren ([Abbildung 53c,d](#)) oder extrem basischen ([Abbildung 53e,f](#)) Umgebungs-pH-Wertes betrachtet.

Parameter	Werte <i>in vivo</i>	Werte in der Simulation			
		$U_m$ als Triebkraft	$U_m$ und $\Delta c_s$ als Triebkraft	aktivierender pH-Gradient	inhibierender pH-Gradient
		<a href="#">Abbildung 52a</a>	<a href="#">Abbildung 52b</a>	<a href="#">Abbildung 53c,d</a>	<a href="#">Abbildung 53e,f</a>
$U_m$	-0,1 V bis -0,16 V	-0,1 V	-0,1 V	-0,1 V	-0,1 V
pHo	5 bis 9	7,6	7,6	5	9
pHi	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6
cso	< 50 mM	1 mM	10 mM	1 mM, 10 mM	1 mM, 10 mM
csi	≈ 0 mM	1 mM	0,1 mM	1 mM, 0,1 mM	1 mM, 0,1 mM

Es ist anzumerken, dass die folgenden Ergebnisse dieser Simulationen stark davon abhängig sind, wie die *Detailed Balance* Bedingung im MKM erfüllt wird. Im vorangehenden Abschnitt wurde diskutiert, weshalb die *Detailed Balance* Bedingung über die Erhöhung der Rückwärtsrate der Konformationsänderung des beladenen Carriers erfüllt wurde ([Seite 136, Tabelle 25](#)). Es wurde jedoch auch gesagt, dass keine Anwendung der *Detailed Balance* Bedingung im MKM alle experimentellen Ergebnisse erklärt.

### **Simulationen mit symmetrischen pH-Werten**

In [Abbildung 52a](#) sind die Ergebnisse einer Simulation gezeigt, in der das Membranpotential als alleinige Triebkraft fungiert. Die äußeren Bedingungen sind mit symmetrischen pH-Werten ( $p_{Hi} = p_{Ho} = 7,6$ ) und symmetrischen Zuckerkonzentrationen ( $c_{si} = c_{so} = 1 \text{ mM}$ ) so gewählt, dass sie den Transport weder begünstigen, noch inhibieren. Die Umgebungs-pH-Werte können als Standard-Bedingungen verstanden werden, denen *E.coli* die meiste Zeit über ausgesetzt ist. Dagegen wurden die Zuckerkonzentrationen pessimistisch gewählt. Tatsächlich sollte die zytoplasmatische Zuckerkonzentration aufgrund des bakteriellen Stoffwechsels wesentlich niedriger und die extrazelluläre Zuckerkonzentration möglicherweise höher sein (siehe [oben](#)).

Im dreidimensionalen Plot ist die Umsatzrate in der dritten Dimension gegen die pKi/pKo-Wertepaare aufgetragen. Die pKi/pKo-Werte der drei *E.coli* Transporter ([Seite 139, Tabelle 26](#)) sind als weiße Datenpunkte zu Vergleichszwecken dargestellt. Die maximal mögliche Umsatzrate ergibt sich unter den genannten Bedingungen für Wertepaare von  $pK_i < 7,6$  und  $pK_o = 7,8 \pm 1$  zu etwa  $30 \text{ s}^{-1}$ . Es ist zu erkennen, dass die simulierten pK-Werte für alle drei Transporter in der Nähe dieser optimalen pK-Werte liegen. Unter den verwendeten Bedingungen ergeben sich Transportraten zwischen  $30 \text{ s}^{-1}$  (FucP) und  $3 \text{ s}^{-1}$  (LacY).

In [Abbildung 52b](#) wird zusätzlich zum Membranpotential ein Zuckergradient ( $c_{si} = 0,1 \text{ mM}$ ;  $c_{so} = 10 \text{ mM}$ ) als Triebkraft für die Simulation verwendet. Dieses Szenario ist wie oben beschrieben näher an der Realität. Durch den Zuckergradienten steigt die maximale Umsatzrate auf  $100 \text{ s}^{-1}$  an. Gleichzeitig verbreitert sich der optimale pKo-Bereich auf  $pK_o = 8 \pm 1,7$ . Dies hat zur Folge, dass die pKi- und pKo-Werte für alle drei *E.coli* Transporter im optimalen Bereich liegen. Es ergeben sich Umsatzraten von etwa  $100 \text{ s}^{-1}$  (FucP) bis  $50 \text{ s}^{-1}$  (LacY). Insbesondere für LacY und XylE ergeben sich damit signifikant höhere Umsatzraten als in der Simulation ohne Zuckergradienten.

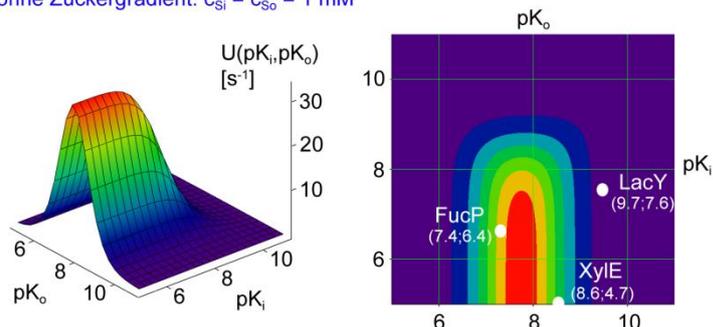
### **Simulationen mit pH-Gradienten**

Wie oben beschrieben schwankt der Umgebungs-pH-Wert von *E.coli* in einem Bereich zwischen pH 5 und pH 9. Weil der zytoplasmatische pH-Wert konstant gehalten wird, kommt es dadurch bedingt zum Aufbau eines pH-Gradienten, der die Potential-getriebene Symport-Aktivität beschleunigen (pHo-Wert ist sauer) bzw. inhibieren (pHo-Wert ist basisch) kann. Dies hat insbesondere dann Auswirkungen, wenn kein Zuckergradient anliegt ([Abbildung 53, links](#)). Dann ergibt sich für die maximale Umsatzrate (statt  $30 \text{ s}^{-1}$  bei symmetrischen pH-Bedingungen mit  $\text{pH} = 7,6$ )  $3 \text{ s}^{-1}$  für  $\text{pH}_o = 9$  bzw.  $60 \text{ s}^{-1}$  für  $\text{pH}_o = 5$ . Mit Zuckergradienten ([Abbildung 53, rechts](#)) ist der Einfluss des pH-Gradienten auf die maximale Umsatzrate vernachlässigbar. Ein Zuckergradient bewirkt im physiologischen pH-Intervall eine Steigerung der maximalen Umsatzrate auf etwa  $100 \text{ s}^{-1}$ . Dies stellt sicher, dass die Transporter bei Zucker-Überschuss unabhängig von den pH-Bedingungen effektiv Zucker aufnehmen können.

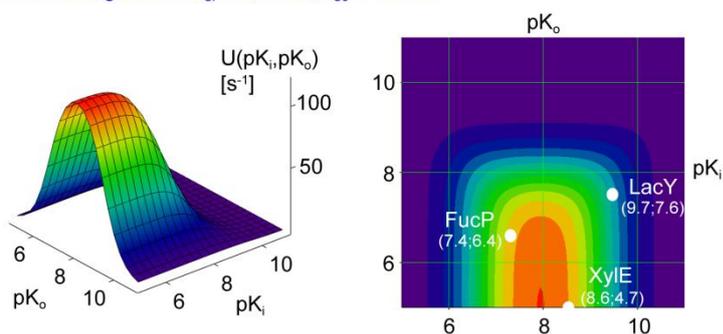
Neben dem Einfluss auf die maximale Umsatzrate, beeinflusst der pH-Gradient oder genauer gesagt der extrazelluläre pH-Wert auch die Position und Breite des pKo-Optimums. Bei einem aktivierenden pH-Gradienten ( $\text{pH}_o = 5$ ) liegt die maximale Aktivität bei sauren pKo-Werten ( $6,5 \pm 1,7$  für  $\Delta c_s = 0$ ). Bei einem inhibierenden pH-Gradienten ( $\text{pH}_o = 9$ ) ist das pKo-Optimum im basischen pKo-Bereich ( $8,5 \pm 1$  für  $\Delta c_s = 0$ ).

$$pH_i = pH_o = 7,6 \quad dU = -100 \text{ mV}$$

(a) ohne Zuckergradient:  $c_{Si} = c_{So} = 1 \text{ mM}$



(b) mit Zuckergradient:  $c_{Si} = 0,1 \text{ mM}$ ,  $c_{So} = 10 \text{ mM}$



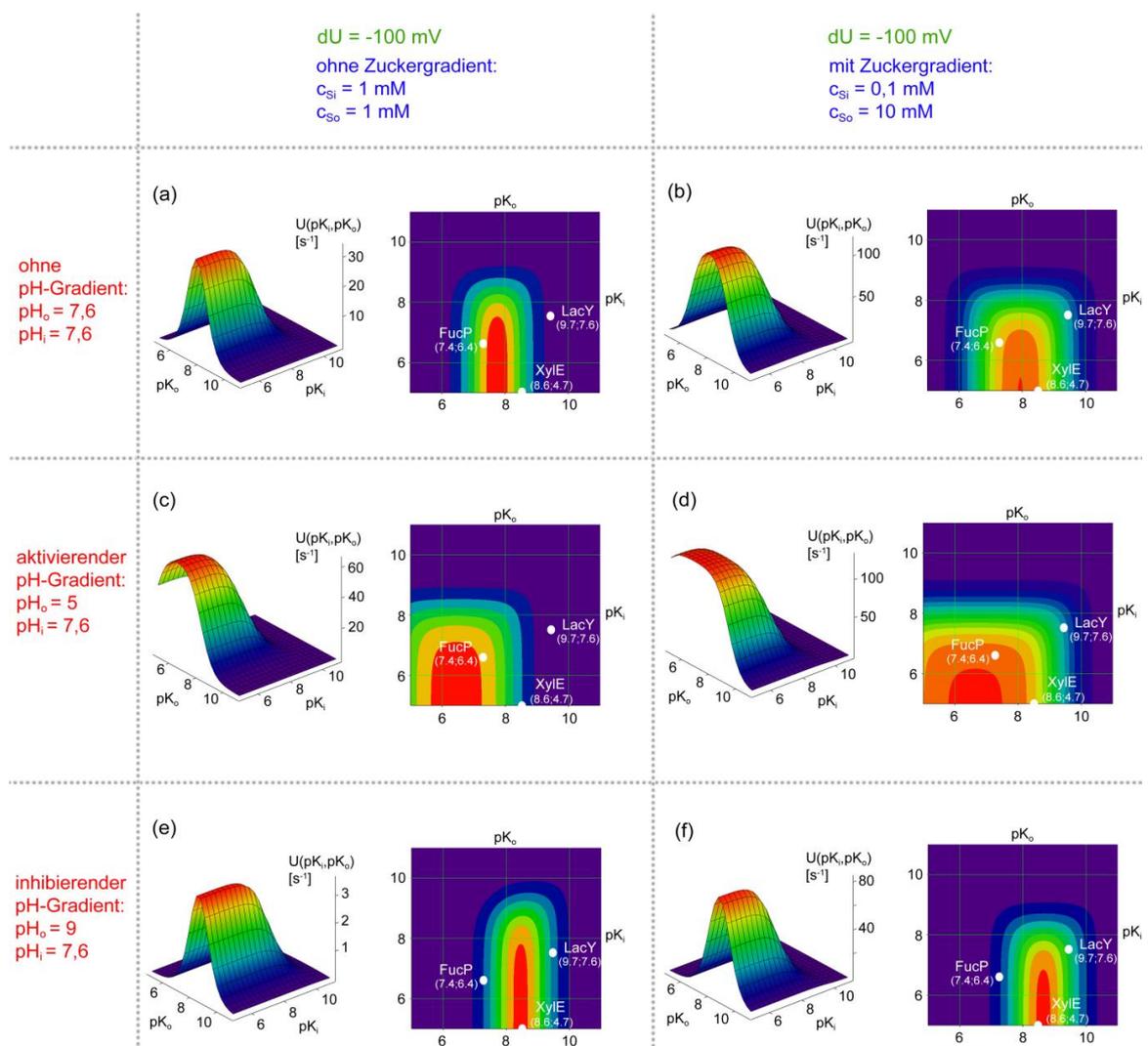
**Abbildung 52: Simulation der Umsatzrate in Abhängigkeit von den pKi- und pKo-Werten im MKM mit symmetrischem pH-Wert ( $pH_i = pH_o = 7,6$ ).** (a) Simulation mit einem Membranpotential von  $U_m = -0,1 \text{ V}$  als alleinige Triebkraft. Die Zuckerkonzentrationen sind symmetrisch ( $c_{Si} = c_{So} = 1 \text{ mM}$ ). (b) Simulation mit  $U_m = -0,1 \text{ V}$  und einem zusätzlichen Zuckergradienten ( $c_{So} = 10 \text{ mM}$ ;  $c_{Si} = 0,1 \text{ mM}$ ). Die pKo- und pKi-Werte der drei *E.coli* Transporter (Seite 139, Tabelle 26) wurden zu Vergleichszwecken als weiße Punkte in den Graphen dargestellt. Die Parameter für die Simulation sind  $K_S = 2 \text{ mM}$ ,  $j_{f0} = j_{r0} = 50 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $j_f(U_m) = 364 \text{ s}^{-1}$  und  $j_r(U_m) = 7 \text{ s}^{-1}$  sowie  $k_f = 250 \text{ s}^{-1}$  und  $k_r = k_f \cdot R$ . Details siehe Seite 60f sowie Haupttext.

Interessanterweise sind die pKo-Werte aller drei *E.coli* Transporter (7,4 bis 9,5) bei inhibierendem pH-Gradienten gleichmäßig um den Bereich der maximalen Umsatzrate ( $8,5 \pm 1$ ) verteilt. So ist sichergestellt, dass bei lebenswidrigen Umgebungs-pH-Werten, die an sich die Umsatzrate schon erheblich reduzieren, alle Transporter die maximal mögliche Umsatzrate erzielen. Bei aktivierendem pH-Gradienten sind die pKo-Werte von LacY und XylE weiter von der maximalen Umsatzrate entfernt. Die absoluten Umsatzraten sind dennoch wesentlich höher als bei inhibierendem pH-Gradienten. Die pKo-Werte der Transporter sind daher sehr wahrscheinlich ein Kompromiss: Selbst bei variierenden pH-Bedingungen wird eine hinreichende Transportaktivität erreicht, um den Energiestoffwechsel des Organismus aufrechterhalten zu können.

Im Gegensatz zum pKo-Optimum bleibt das pKi-Optimum erwartungsgemäß unbeeinflusst vom extrazellulären pH-Wert. Es liegt für alle pH-Gradienten bei  $pK_i < 7,5$ . Aus diesem Grund gibt es keinen großen evolutionären Druck auf die pKi-Werte, die für die drei *E.coli* Transporter relativ unterschiedlich ausfallen (4,7 - 7,6), aber immer im optimalen Bereich liegen. Bei anderer Anwendung der *Detailed Balance* Bedingung (z.B. im LC-Szenarium, wenn die Potential-abhängige

Reaktion die Protonenfreisetzung darstellt oder bei der gleichzeitigen Erhöhung von Vorwärts- und Rückwärtsratenkonstante im BC-Szenarium) würden saure pKi-Werte die Umsatzrate reduzieren (*Daten nicht gezeigt*). Insbesondere für XylE würden sich dann unter physiologischen Bedingungen keine realistischen Umsatzraten ergeben. Dies bestätigt, dass das BC-Szenarium und die Erhöhung der Rückwärtsratenkonstante die Realität am besten widerspiegelt.

Ohne Zuckergradient ermöglicht ein Membranpotential von  $-0,1$  V den Zucker-Protonen-Sympport bis zu einem äußeren pHo-Wert von 9,3. Basischere pHo-Werte bewirken eine Umkehr des Protonenflusses und damit einen Zucker-Efflux. Diese Beobachtung stimmt sehr gut damit überein, dass *E.coli* überlebensfähig bis zu einem Umgebungs-pH-Wert von etwa 9 ist [258].



**Abbildung 53: Simulation der Umsatzrate in Abhängigkeit von den pKi- und pKo-Werten im MKM mit asymmetrischen pH-Werten.** In allen Fällen liegt ein Membranpotential von  $U_m = -0,1$  V an. Links sind Umgebungen ohne Zuckergradient ( $c_{Si} = c_{So} = 1$  mM), rechts mit Zuckergradient ( $c_{So} = 10$  mM;  $c_{Si} = 0,1$  mM) simuliert. In (a) und (b) sind die Graphen aus *Abbildung 52* (symmetrische pH-Bedingungen mit  $pH = 7,6$ ) zu Vergleichszwecken gegenübergestellt. In (c) und (d) wird ein aktivierender pH-Gradient simuliert ( $pH_o = 5$ ,  $pH_i = 7,6$ ). In (e) und (f) wird ein inhibierender pH-Gradient simuliert ( $pH_o = 9$ ,  $pH_i = 7,6$ ). Die pKo- und pKi-Werte der drei *E.coli* Transporter (*Seite 139, Tabelle 26*) wurden zu Vergleichszwecken als weiße Punkte in den Graphen dargestellt. Die Parameter für die Simulation sind  $K_S = 2$  mM,  $j_{f0} = j_{r0} = 50$   $s^{-1}$  bzw.  $j_f(U_m) = 364$   $s^{-1}$  und  $j_r(U_m) = 7$   $s^{-1}$  sowie  $k_f = 250$   $s^{-1}$  und  $k_r = k_f \cdot R$ . Details siehe *Seite 60f* sowie Haupttext.

# 4

---

## DISKUSSION

---

Es wurde in der vorliegenden Arbeit für vier verschiedene Transporter derselben Superfamilie dieselbe Reaktion untersucht: Der Symport von Zucker und Proton, getrieben durch den Zuckergradienten. Während die Gesamtreaktion dieselbe bleibt, können sich zugrunde liegender Mechanismus und kinetische Parameter der Einzelreaktionen voneinander unterscheiden. Komparative Untersuchungen ermöglichen Erkenntnisse darüber wie weit die Konservierung des Transportmechanismus reicht und wo genau Besonderheiten eines bestimmten Transporters beginnen.

LacY eignet sich für diesen Zweck als ideale Basis. Es ist eines der beststudiertesten Proteine überhaupt, wie ausführlich auf [Seite 19f](#) dargestellt. So wurde bereits anhand von SSM-Messungen ein kinetisches Modell postuliert, das Ausgangspunkt für die Betrachtungen der hier untersuchten Transporter darstellt [\[163\]](#). In diesem Modell sind zwei elektrogene Reaktionen definiert: Die Zucker-induzierte Bildung eines okkludierten Zustandes und die Protonenfreisetzung. Erstere wird nur als *pre steady-state* Signal detektiert, während zweitere den *steady-state* dominiert. FucP zeigt bezüglich der relativen Position funktionsrelevanter Aminosäuren die größte Ähnlichkeit zu LacY, wie auf [Seite A4f](#) beschrieben. Sowohl FucP als auch XylE unterscheiden sich von LacY durch höhere Affinitäten zu ihren Hauptsubstraten im physiologischen pH-Bereich ([Seite 82, Tabelle 14](#)), niedrigere pKb- und pKa-Werte für Protonenbindung und Protonenfreisetzung ([Seite 103, Tabelle 19](#)) sowie eine große Variation in der Elektrogenität der *pre steady-state* Reaktion ([Seite 107, Tabelle 20](#)).

Die Unterschiede zwischen GlcP und den drei *E.coli* Transportern gehen jedoch weit über diese Eigenschaften hinaus. Fungiert ausschließlich der Zuckergradient als Triebkraft, katalysiert GlcP im Gegensatz zu den *E.coli* Transportern keinen elektrogenen stationären Transport ([Seite 118, Abbildung 41](#)). Oberhalb des pKb-Wertes wird eine *pre steady-state* Reaktion detektiert, die auf Basis radioaktiver Transportmessungen mit dem Transport eines Zuckermoleküls im unprotonierten

Carrier in Verbindung gebracht werden konnte ([Seite 125, Abbildung 46](#)). Während die Umsatzrate der *E.coli* Transporter nicht durch einen pH-Gradienten beschleunigt werden kann, katalysiert GlcP nur unter Einfluss eines entsprechend gerichteten pH-Gradienten elektrogenen stationären Transport ([Seite 124, Abbildung 45](#)). GlcP ist gleichermaßen dazu in der Lage Uniport, Symport und Antiport zu katalysieren.

Auf Basis dieser Erkenntnisse sollen kinetische Modelle und Mechanismen diskutiert werden, welche den PMF-gekoppelten Zucker-Transport in Proteinen der MFS umfassend erklären könnten. Als Basis dient das 8-Zustands-Modell ([Seite 150, Abbildung 54](#)), welches das MKM ([Seite 61, Abbildung 18](#)) unter anderem um die einwärts- sowie auswärtsgerichtete unprotonierte, Zucker-gebundene Konformation (PS) erweitert. Es wird ausführlich diskutiert welche Reaktionen in diesem Modell elektrogen sind ([Seite 165, Abbildung 55](#)) und wie die äußeren Bedingungen die ratenlimitierende Reaktion im Symport ([Seite 177, Abbildung 59](#)), aber auch den Transportmodus selbst ([Seite 193, Abbildung 62; Seite 195, Abbildung 63](#)) beeinflussen. Nur wenige beobachtete Phänomene können nicht mit dem 8-Zustands-Modell erklärt werden. Der beobachtete pK-switch ist eines dieser Phänomene. Hierfür wurde auf Basis der 3D-Strukturen ein molekulares Modell entwickelt, das den pK-switch unter Erhaltung von symmetrischem Transporter-Verhalten, d.h. identischen Eigenschaften für Influx und Efflux, erklärt ([Seite 188, Abbildung 61](#)).

## Das 8-Zustands-Modell beschreibt alle Transportmodi

Wird die *Detailed Balance* Bedingung im MKM auf die Rückwärtsrate der Konformationsänderung des beladenen Carriers angewendet, eignet sich das 6-Zustands-Modell zur Beschreibung der Umsatzrate im PMF-gekoppelten Influx-Modus unter verschiedenen äußeren Bedingungen ([Seite 139, Tabelle 26](#)). Das MKM beschreibt jedoch nicht alle möglichen Transportmoden und berücksichtigt nicht alle experimentellen Daten. So wird die Zuckerbindung an den unprotonierten Carrier vernachlässigt [164]. Der für E325A LacY gezeigte Uniport-Modus [80] und der Antiport in GlcP ([Seite 124, Abbildung 45](#)) sind im MKM ebenfalls nicht realisierbar. Das hier vorgestellte 8-Zustands-Modell berücksichtigt diese experimentellen Daten. Es ermöglicht gleichermaßen die Beschreibung von Uniport, Symport und Antiport, abhängig von den äußeren Bedingungen ([Seite 193, Abbildung 62; Seite 195, Abbildung 63](#)).

## Das 8-Zustands-Modell beschreibt GlcP und die *E.coli* Transporter

Das 8-Zustands-Modell ([Abbildung 54](#)) beinhaltet das 6-Zustands-Modell (MKM) ([Seite 61, Abbildung 18](#)), erweitert es um zwei zusätzliche Konformationsänderungen und berücksichtigt, dass die Reihenfolge der Zucker- und Protonenbindung nicht festgelegt ist. Im auswärtsgerichteten Zustand

kann sowohl der protonierte als auch der unprotonierte Transporter das Zuckermolekül binden, wie das Vorhandensein einer Zucker-induzierten *pre steady-state* Reaktion bei pH-Werten  $> pK_b$  zeigt (Seite 109, Tabelle 21). Der schnellen Zuckerbindung folgt ein elektrogener *induced fit* (Seite 76, Abbildung 24), der für die meist positive Ladungsverschiebung von durchschnittlich 0,25 e verantwortlich ist. In dem Modell sind die schnelle Zuckerbindung und der *induced fit* zu einer Reaktion mit etwa  $300 \text{ s}^{-1}$  zusammengefasst, wie ausführlicher in Abbildung 55 (Seite 165) dargestellt. Ausgehend vom Substrat-gebundenen unprotonierten Carrier erfolgt für LacY, FucP und XylE sehr wahrscheinlich keine Konformationsänderung in den einwärtsgerichteten Zustand, was durch das Fehlen der *pre steady-state* Reaktion mit negativer Amplitude für  $\text{pH} > pK_b$  deutlich wird (Seite 106, Abbildung 36). In GlcP wird eine solche Vorzeichenumkehr des *pre steady-state* Signals beobachtet: Hier findet diese Konformationsänderung statt (Seite 118, Abbildung 41).

Für LacY, FucP und XylE erklärt dieses Modell sowohl Zucker-Austausch und -Uniport als auch den Symport-Modus. Die Zuckerbindung an den protonierten Carrier induziert die Konformationsänderung in den einwärtsgerichteten Zustand. Nach der Zuckerfreisetzung in der einwärtsgerichteten Konformation liegt der Transporter im Zustand  $P_{in}H$  vor. Nun konkurrieren drei Reaktionen miteinander, welche abhängig von den äußeren Bedingungen den Transport-Modus definieren.

- (1) **Zucker-Austausch:** Es können die erneute Zuckerbindung und dieselbe Reaktionsfolge in die entgegengesetzte Richtung stattfinden. Dann ist nur ein Teilzyklus aktiv, sodass Zucker-Austausch katalysiert wird. Dieser Transportmodus ergibt sich, wenn keine Triebkraft für eine Netto-Zuckertranslokation vorliegt.
- (2) **Zucker-Uniport im permanent protonierten Carrier:** Alternativ kann  $P_{in}H$  in  $P_{out}H$  übergehen. So wird abhängig vom Zuckergradienten Efflux bzw. Influx im elektroneutralen Uniport-Modus katalysiert, wie er auch für E325A LacY beobachtet wird [80].
- (3) **Zucker-Symport:** Im Symport-Modus erfolgen die Protonenfreisetzung und die elektrogene Konformationsänderung des leeren, negativ geladenen Carriers  $P_{in}$  in die auswärtsgerichtete Konformation, wo die erneute Protonenbindung stattfindet.

Es ist wichtig zu berücksichtigen, dass für die wt Transporter die Konformationsänderung zwischen  $P_{out}H$  und  $P_{in}H$  eine Protonenleitfähigkeit bedeutet. Diese hat *in vivo* vermutlich keinen signifikanten Effekt auf die Energetik des Transports, könnte aber zu einer Abweichung der exakten 1:1 Stöchiometrie im Symport-Modus führen. Mechanismen der Flusskopplung könnten sicherstellen, dass diese Konformationsänderung so selten wie möglich erfolgt. Dennoch ist die Ratenkonstante dieser Konformationsänderung groß genug, um in den OE-Mutanten den experimentell

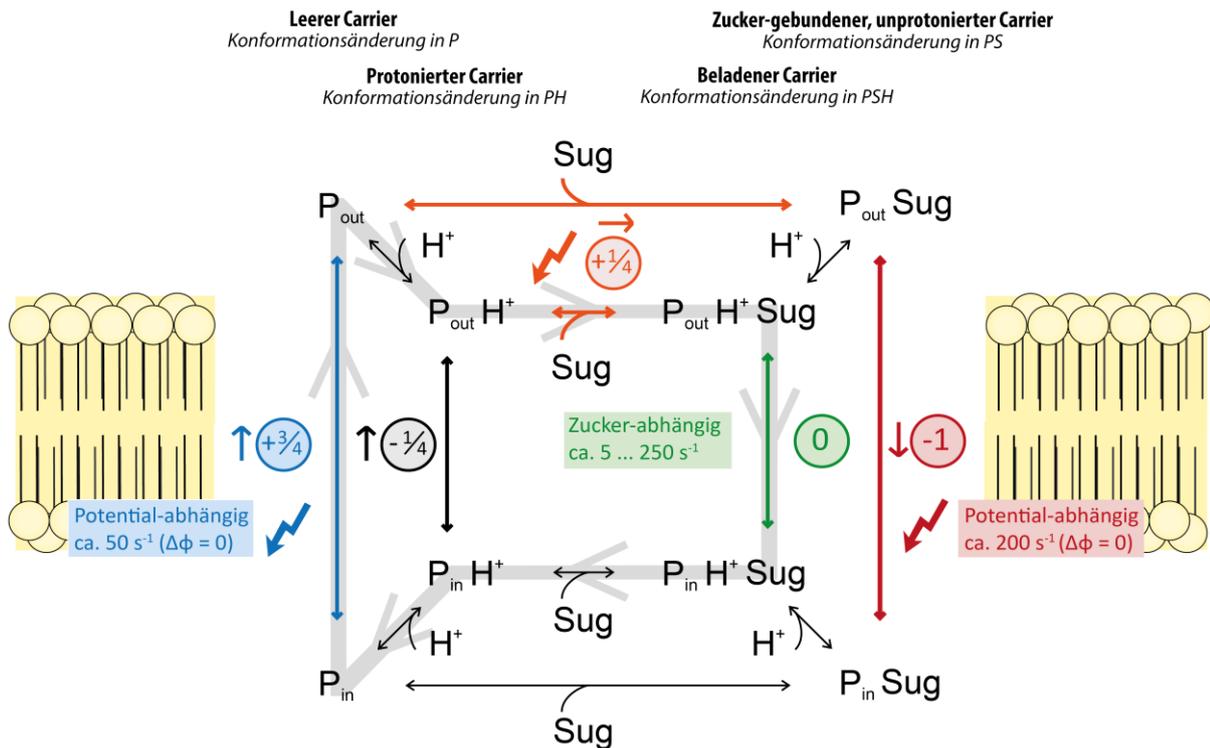
nachgewiesenen Efflux zu ermöglichen [80]. Es ist zu betonen, dass im Rahmen dieser Überlegungen die OE-Mutanten mit den protonierten wt Transportern gleichgesetzt werden.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen GlcP und den *E.coli* Transportern ist die geringe oder nicht vorhandene Kopplung zwischen Protonen- und Zuckertranslokation. Uniport, Symport und Antiport sind in GlcP miteinander konkurrierende Transportwege. Neben den Reaktionen (1) bis (3) finden in GlcP auch folgende Reaktionen (4) und (5) statt.

- (4) **Zucker-Antiport:** Die Konformationsänderung des beladenen Carriers kann in GlcP auch im unprotonierten Zustand erfolgen ( $P_{out}S$  zu  $P_{in}S$ ). Im einwärtsgerichteten Zustand erfolgt dann die Zuckerfreisetzung und Protonierung, gefolgt von der Konformationsänderung des leeren Carriers ( $P_{in}H$  zu  $P_{out}H$ ).
- (5) **Zucker-Uniport im permanent unprotonierten Carrier:** Analog zum Zucker-Uniport der *E.coli* Transporter, katalysiert GlcP auch im unprotonierten Zustand Uniport. Der Zucker induziert die Konformationsänderung im unprotonierten Carrier ( $P_{out}S$  zu  $P_{in}S$ ), woraufhin Zuckerfreisetzung und Konformationsänderung des leeren Carriers ( $P_{in}$  zu  $P_{out}$ ) erfolgen.

Haben alle vier Konformationsänderungen identische Ratenkonstanten, so ist der Transportmodus (Uniport, Symport, Antiport) ausschließlich von den äußeren Bedingungen (pH-Werte, Zuckerkonzentrationen, Membranpotential) abhängig. Unterscheiden sich die Ratenkonstanten der einzelnen Konformationsänderungen voneinander, können bestimmte Transportmodi bevorzugt sein, auch bei widrigen äußeren Bedingungen. Dies ist sehr wahrscheinlich für die *E.coli* Transporter der Fall. Die Konformationsänderung des beladenen, unprotonierten Carriers (PS) findet nicht oder mit einer zu vernachlässigenden Ratenkonstante statt, weshalb die Reaktionen (4) und (5) in LacY und FucP nicht zu beobachten sind (Seite 109, Tabelle 21).

Für Zucker-Austausch und -Uniport ist lediglich die *pre steady-state* Reaktion elektrophysiologisch messbar, sodass diese Transportmodi elektrophysiologisch nicht voneinander unterschieden werden können. Im Symport-Modus ist die Konformationsänderung des leeren Carriers aufgrund des Transfers der negativ geladenen Protonenbindestelle auch im *steady-state* elektrogen. Im Antiport-Modus ist der *steady-state* durch die Konformationsänderung des Zucker-gebundenen unprotonierten Carriers elektrogen. Beide Reaktionen transferieren genau eine Elementarladung pro Reaktionszyklus über die Membran. Eine ausführliche Beschreibung der elektrogenen Reaktionen findet sich auf Seite 163f.



**Abbildung 54: Das 8-Zustands-Modell.** Der grau hinterlegte Pfad repräsentiert den einwärtsgerichteten Symport-Modus, wie er auch im MKM (6-Zustandsmodell) der *E.coli* Transporter angenommen wird (Seite 61, Abbildung 18). Das Modell zeigt, dass die äußeren Bedingungen ( $c_{si}$ ,  $c_{so}$ ,  $pH_i$ ,  $pH_o$ , Substrat-Spezies, Membranpotential) nicht nur die ratenlimitierende Reaktion sondern auch den Transport-Modus selbst bestimmen (Austausch, Uniport, Symport, Antiport). Dabei beeinflussen die Substrat-Spezies und das Potential direkt die Ratenkonstanten der Konformationsänderungen, während  $c_s$  und  $pH$  über die vorgelagerten Gleichgewichte die effektiven Raten der Konformationsänderungen beeinflussen (Seite 177, Abbildung 59). *In vivo* spielt aufgrund der Stabilität von  $\Delta\mu_{H^+}$  sehr wahrscheinlich nur der Symport-Modus eine Rolle, während unter experimentellen Bedingungen verschiedene Transportmodi beobachtet werden können (Seite 193, Abbildung 62; Seite 195, Abbildung 63). Die einzelnen elektrogenen Reaktionen sind mit einem Blitz gekennzeichnet. Der entsprechende Ladungstransfer in der Einheit der Elementarladung ist eingekreist. Erläuterungen zu der Ladungsbilanz sind auf Seite 163f ausgeführt (Abbildung 55). **Orange:** Die Bindung des Zuckers (schnelles Gleichgewicht) und der nachfolgende elektrogene *induced fit* (Seite 76, Abbildung 24) werden zu einer Reaktion zusammengefasst. Die Zuckerbindung ist in allen Transportern sowohl an den protonierten als auch an den unprotonierten Carrier möglich (Seite 109, Tabelle 21). Sie ist nur elektrophysiologisch messbar, wenn der elektrogene *steady-state* inhibiert ist. Die Ratenkonstante des *induced fits* ist mit  $>300\text{ s}^{-1}$  meist sehr schnell und in allen Transportern elektrogen (Seite 107, Tabelle 20). **Blau:** Die Konformationsänderung in P. Der Transfer der negativ geladenen Protonenbindestelle infolge der Deprotonierung macht diese Konformationsänderung zur elektrogenen Reaktion im *steady-state* Symport aller Transporter. Die Angabe der Ratenkonstante bezieht sich auf LacY [165–167]. Die Reaktion wurde mit dem elektrogenen Öffnen der Kavität zusammengefasst ( $1e - 0,25e = 0,75e$ , Seite 165, Abbildung 55). Die effektive Rate der Konformationsänderung des leeren Carriers ist abhängig vom vorgelagerten Gleichgewicht der Protonenfreisetzung; die Ratenkonstante ist abhängig vom Membranpotential. Die Angabe bezieht sich auf experimentelle Ergebnisse aus der Literatur [168]. **Rot:** Die Konformationsänderung in PS. Wie bei der Konformationsänderung in P ist der Transfer der negativ geladenen Protonenbindestelle infolge der Zucker-Bindung elektrogen; Diese Reaktion wird nur in wt GlcP für  $pH_o > pK_b$  beobachtet, und zwar als *pre steady-state* Signal im Uniport oder Austausch (Seite 118, Abbildung 41) oder als *steady-state* Signal im Antiport (Seite 124, Abbildung 45). Die Angabe der Ratenkonstante bezieht sich auf die Abklingzeit des *pre steady-state* Signals in GlcP (Seite 107, Tabelle 20). Für die *E.coli* Transporter gibt es keine Konformationsänderung in PS, was durch ein fehlendes negatives *pre steady-state* Signal für  $pH > pK_b$  in LacY, FucP und XylE bestätigt wird (Seite 106, Abbildung 36). **Grün:** Die Konformationsänderung in PSH ist nicht elektrogen, da die Protonenbindestelle neutralisiert ist. Die effektive Rate der Konformationsänderung ist abhängig vom Zuckersubstrat (Seite 171, Abbildung 56). Die Angaben beziehen sich auf LacY ( $250\text{ s}^{-1}$  für D-Lactose [163]) und einer einfachen Abschätzung für TDG (Umsatzrate von D-Lactose ist  $30\text{ s}^{-1}$  [73]; TDG zeigt 20% der Umsatzrate von D-Lactose). **Schwarz:** Die Konformationsänderung in PH ist berücksichtigt, um Zucker-Uniport in den OE-Mutanten der *E.coli* Transporter zu erklären, wie er für LacY [80] oder FucP (Seite 13, Abbildung 67b) beobachtet wird. Eine nähere Betrachtung dazu findet sich auf Seite 153f. Da die Reaktion mit dem elektrogenen Öffnen der Kavität zusammengefasst ist, transferiert sie  $-0,25\text{ e}$ .

## Bindung und Freisetzung der Substrate erfolgen nicht geordnet

LacY, XylE und FucP zeigen hohe  $pK_b$ -Werte  $> 9,4$  (Seite 103, Tabelle 19). Im Darm herrschen pH-Werte  $< 9,5$  [174, 175], sodass das Gleichgewicht des auswärtsgerichteten Carriers für alle drei *E.coli* Transporter auf Seiten des protonierten Zustands liegt. Darüber hinaus steigen die  $K_M$ -Werte mit dem pH-Wert, sodass die Protonenbindung die Affinität zum Zucker erhöht (Seite 82, Tabelle 14). Für LacY wurden diese Gegebenheiten so interpretiert, dass die Protonierung der Zuckerbindung vorausgeht und die Zuckerbindung die Konformationsänderung induziert [164, 176, 177].

Ein kinetisches Modell auf Basis dieser Sichtweise beschreibt die experimentellen Daten jedoch nicht korrekt. So zeigen in der Literatur veröffentlichten Daten, dass die *on*-Rate der Zuckerbindung pH-unabhängig ist [164]. Der Zucker kann demnach vor dem Proton binden. Der Zucker-gebundene Transporter ist im unprotonierten Zustand jedoch instabil, wie die mit dem pH-Wert zunehmende *off*-Rate der Zuckerbindung zeigt. Erst wenn das Proton gebunden hat, wird der Zucker-gebundene Zustand stabilisiert. Eine Bestätigung dieser Interpretation liefert das Vorhandensein eines *pre steady-state* Signals mit positiver Amplitude in wt LacY und wt FucP weit oberhalb ihrer  $pK_b$ -Werte (Seite 106, Abbildung 36). Wenn der Carrier protoniert sein muss, um den Zucker zu binden, müsste für pH-Werte oberhalb des  $pK_b$ -Wertes das *pre steady-state* Signal verschwinden. Bei Messungen mit pH-Werten, die eine pH-Einheit über dem  $pK_b$ -Wert des jeweiligen Transporters liegen, sind nur 10 % der Transporter protoniert. Erfolgt die Zuckerbindung nur an den protonierten Carrier, dürfte das *pre steady-state* Signal unter diesen Bedingungen nur 10 % der Ladung des *pre steady-state* Signals bei pH-Werten kleiner des  $pK_b$ -Wertes verschieben. Tatsächlich zeigt die Ladung keine solche pH-Abhängigkeit: Oberhalb des  $pK_b$ -Wertes für wt LacY (Seite 106, Abbildung 36b, pH 11,5) ist das *pre steady-state* Signal gemäß der pH-Abhängigkeit von E325A LacY (Seite 108, Abbildung 37a) verhältnismäßig größer als das unterhalb des  $pK_b$ -Wertes (Seite 106, Abbildung 36a, pH 5,0). Der Protonierungszustand hat damit keinen Einfluss auf die Zuckerbindung. Der Zucker bindet gleichermaßen an den protonierten wie an den unprotonierten Carrier.

In GlcP resultiert ein anderes Ergebnis für die pH-Abhängigkeit der *pre steady-state* Reaktionen. Oberhalb des  $pK_b$ -Wertes induziert die Zuckerbindung ein elektrogenes Signal mit negativer Amplitude, unterhalb des  $pK_b$ -Wertes zeigt das *pre steady-state* Signal wie in den *E.coli* Transportern eine positive Amplitude (Seite 118, Abbildung 41). Auch hier findet die Zuckerbindung an den unprotonierten Carrier statt. Im Gegensatz zu den *E.coli* Transportern folgt jedoch eine zusätzliche, elektrogene Reaktion, die nur im unprotonierten Carrier stattfindet: Die Konformationsänderung im Zucker-gebundenen, unprotonierten Zustand.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein weiterer Hinweis darauf gefunden, dass in den *E.coli* Transportern die Zuckerbindung auch an den unprotonierten Carrier stattfinden könnte, aber die nachfolgende Konformationsänderung nicht stattfindet. So lässt sich die Konzentrations-Abhängigkeit der Peakströme für einige sekundäre Substrate besser mit einem Hill-Fit annähern, als mit einer hyperbolischen Funktion ([Seite 81, Abbildung 26](#)). Dies ist kompatibel mit einer Substratinhibition. Wenn für sekundäre Substrate der Zustand PS gegenüber dem Zustand PSH stabilisiert ist, aber die nachfolgende Konformationsänderung nur in PSH stattfinden kann, inhibieren hohe Konzentrationen an sekundärem Substrat den Transport. Dies erklärt dann die Hill-Kinetik. Dass der Transporter-Zustand mit gebundenen sekundären Substraten sehr von dem mit gebundenem Hauptsubstrat abweicht, zeigen bereits die unterschiedlichen Ladungsverschiebungen im *induced fit* ([Seite 87, Tabelle 16](#)) sowie der Einfluss des Substrats auf das Interaktionsnetzwerk der Transporter ([Seite A10, Abbildung 65](#)). So könnte der Einfluss des Substrats auf den Transporter-Zustand auch eine bessere Bindung an den unprotonierten Carrier ermöglichen.

Es ist anzumerken, dass die Protonierung von PS in LacY sehr wahrscheinlich benachteiligt ist. 3D-Strukturen zeigen, dass der Zugang zur Protonenbindestelle durch den Zucker blockiert sein könnte [\[135\]](#). Für die Reaktion von  $P_{out}S$  zu  $P_{out}SH$  kann daher eine niedrige Ratenkonstante angenommen werden. Im *steady-state* Symport-Modus für die Hauptsubstrate dominiert sehr wahrscheinlich die Reaktionsfolge  $P_{out}$  zu  $P_{out}H$  zu  $P_{out}SH$ , weshalb sich die Annahme einer geordneten Bindungsreihenfolge im MKM, zumindest für LacY als gute Näherung herausstellt.

Im MKM wird zwecks Symmetrie-Erhaltung angenommen, dass die Zuckerfreisetzung auch vor der Protonenfreisetzung erfolgt. Für LacY gibt es experimentelle Hinweise dafür [\[124\]](#). Zum einen wurde gezeigt, dass die Deprotonierung die Konformationsänderung des leeren Carriers induziert [\[178\]](#). Zum anderen machen die gelösten Strukturen deutlich, dass erst durch die Freisetzung des Zuckers Platz für ein Wassermolekül in der Kavität geschaffen wird, das dann die Protonenfreisetzung erleichtert [\[135\]](#). Für XylE gibt es jedoch auch Hinweise dafür, dass die Protonenfreisetzung vor der Zuckerfreisetzung erfolgen kann [\[142\]](#). Zudem konnte elektrophysiologisch gezeigt werden, dass infolge der Bindung von D-Glucose die Protonenfreisetzung stattfindet ([Seite 129, Abbildung 47](#)), ohne dass der Zucker auf der anderen Seite der Membran freigesetzt wird [\[132\]](#).

Insgesamt muss ein vollständiges kinetisches Modell berücksichtigen, dass Zucker und Proton unabhängig voneinander binden und freigesetzt werden können. Die Ratenkonstanten der Bindung und Freisetzung sind zumindest in den *E.coli* Transportern sehr wahrscheinlich abhängig davon, welches Substrat als erstes bindet bzw. freigesetzt wird (Kooperativität).

## Konformationsänderung im protonierten Carrier (PH)

Die zu den prokaryotischen Symportern XylE und GlcP homologen Uniporter GLUT1, 3, 4, 5, 7, 9 und 11 besitzen anstatt der Protonenbindestelle einen neutralen Asparagin-Rest. In dieser Hinsicht gleichen die OE-Mutanten der prokaryotischen Transporter, bei denen die Protonenbindestelle neutralisiert ist, den humanen GLUTs. Die Vermutung liegt nahe, dass erstere nicht nur Zucker-Austausch, sondern auch Uniport katalysieren.

Die OE-Mutanten der einzelnen Transporter wurden hinsichtlich ihrer *Uptake*- und *Counterflow*-Aktivitäten getestet. So sind E325A LacY [80], D46N FucP [131], D27N XylE [144] und D22N GlcP [133] nicht in der Lage Potential-getriebenen Zucker zu akkumulieren, während die Zucker-Austausch-Aktivität unbeeinträchtigt ist. Um Zucker zu akkumulieren, also Uniport zu katalysieren, muss jedoch die Konformationsänderung des leeren Carriers mit der neutralisierten Protonenbindestelle erfolgen. Dies kann durch Zuckergradienten-getriebene Efflux/Influx-Experimente geprüft werden.

Für E325A LacY wurden Influx- und Efflux-Aktivitäten gezeigt. Sie liegen in derselben Größenordnung wie die des wt [80]. Auch D46N FucP zeigt im *Counterflow*-Experiment Efflux (Seite A13, Abbildung 67), genauso wie D22N GlcP [133]. Die elektrophysiologischen Messungen an den OE-Mutanten zeigen, dass kein elektrogener *steady-state* erfolgt und die Influx/Efflux-Aktivitäten daher auf elektroneutralen Uniport zurückführbar sind. Die Konformationsänderung des leeren, neutralisierten Carriers findet also statt. Da OE-Mutanten als permanent protonierte wt Transporter betrachtet werden können, deutet dies darauf hin, dass auch der protonierte Carrier ohne gebundenen Zucker (PH) die Membran passieren kann und zu einer endlichen Uniport-Rate in den wt Transportern beitragen könnte. Die Konformationsänderung im protonierten Carrier muss in das kinetische Modell integriert werden, um den Uniport-Modus in LacY, FucP und XylE zu berücksichtigen. Gleichzeitig stellt diese Konformationsänderung aber auch einen energetisch nachteiligen Protonentranslokationsweg dar.

## Konformationsänderung im unprotonierten, beladenen Carrier (PS)

Sowohl die *E.coli* Transporter als auch GlcP können den Zucker im unprotonierten Zustand binden (siehe oben). Der Protonierungszustand beeinflusst jedoch nur in GlcP das *pre steady-state* Signal: Die pH-Abhängigkeit der *pre steady-state* Reaktion in wt GlcP (Seite 118, Abbildung 41) zeigt oberhalb des pK<sub>b</sub>-Wertes eine Vorzeichenumkehr. In FucP und LacY bleibt die positive Amplitude des *pre steady-state* Signals oberhalb des pK<sub>b</sub>-Wertes erhalten (Seite 106, Abbildung 36). Bei dem negativen *pre steady-state* Signal in wt GlcP handelt es sich daher sehr wahrscheinlich um eine Reaktion, die in den *E.coli* Transportern nicht beobachtet wird.

Messungen an wt GlcP zeigen, dass der Bindung an den unprotonierten Carrier auch eine Konformationsänderung folgt. Oberhalb des  $pK_b$ -Wertes ist die Geschwindigkeit des Zucker-Austauschs nicht reduziert ([Seite 125, Abbildung 46c](#)). Sollte die *Exchange*-Rate für basische pH-Werte  $> pK_b$  gegen null gehen, würde dies darauf hinweisen, dass der Bindung an den unprotonierten Carrier keine Zucker-Freisetzung folgt und damit die Konformationsänderung des unprotonierten beladenen Carriers sehr wahrscheinlich nicht stattfindet. Tatsächlich ist die *Exchange*-Rate bis pH 9,5 unabhängig vom pH-Wert. Ob nun etwa 10 % (pH 9,5,  $pK_b$  8,6) oder fast 100 % (pH 5,5) der Transporter im protonierten Zustand vorliegen, hat keinen Einfluss auf die *Exchange*-Rate. In GlcP wird daher für  $pH > pK_b$  die negative Ladung der Protonenbindestelle Zucker-induziert über die Membran transferiert, was für das negative *pre steady-state* bei pH-Werten  $> pK_b$  verantwortlich gemacht werden kann. Dass der negativ geladene Carrier prinzipiell nach Zuckerbindung dazu in der Lage ist die Membran zu passieren, zeigt auch der humane GLUT2. Es handelt sich um einen Uniporter, bei dem die zur Protonenbindestelle der prokaryotischen Transporter homologe Aminosäure im Gegensatz zu den anderen GLUTs negativ geladen ist [[144](#)].

Da die *E.coli* Transporter sehr hohe  $pK_b$ -Werte zeigen, sind vergleichende Betrachtungen erschwert. Für LacY ist die Zucker-Austausch Aktivität zwischen pH 5,5 und pH 10 zwar unabhängig vom pH-Wert [[89](#)]. Dies ist aber dadurch bedingt, dass LacY einen  $pK_b$ -Wert von 10,9 aufweist ([Seite 103, Tabelle 19](#)). Für XylE und FucP sind pH-Abhängigkeiten der *Exchange*-Raten nicht publiziert. Die pH-Abhängigkeiten im *Counterflow*-Experiment sind nicht für Vergleiche geeignet, da sich eine pH-Abhängigkeit auch durch die Efflux-Aktivität im Symport-Modus ergeben könnte. Die elektrophysiologischen Messungen an den *E.coli* wt Transportern bei pH-Werten  $> pK_b$  zeigen jedoch, dass eine Vorzeichenumkehr der *pre steady-state* Signale wie in GlcP nicht beobachtet wird. Es wird lediglich das *pre steady-state* Signal positiver Ladung detektiert, das dem *induced fit* entspricht ([Seite 106, Abbildung 36d,e](#)). *E.coli* Transporter sind damit sehr wahrscheinlich nicht in der Lage nach der Zuckerbindung an den unprotonierten Carrier Zucker-Austausch oder Uniport zu katalysieren, weil der Zuckerbindung an den unprotonierten Carrier keine Konformationsänderung des beladenen Carriers folgt. In den *E.coli* Transportern ist im Gegensatz zu GlcP die Aktivierungsenergie für die Konformationsänderung im unprotonierten Zustand sehr wahrscheinlich gegenüber der im protonierten Zustand erhöht, was die Konformationsänderung von PS verhindert.

Durch diesen Vergleich wird deutlich, dass die *pre steady-state* Reaktion negativer Ladung bei pH-Werten oberhalb des  $pK_b$ -Wertes in GlcP der Konformationsänderung des beladenen, unprotonierten Carriers zuzuordnen ist. Diese Reaktion überdeckt den elektrogenen *induced fit*, der eine positive Amplitude aufweist.

## Jeder Transporter zeigt zwei elementare elektrogene Reaktionen

Der Transportzyklus aller vier untersuchten Zucker-Transporter beinhaltet zwei elektrogene Reaktionen. Eine korrekte Zuordnung der elektrogenen Reaktionen zu Teilreaktionen im Transportzyklus ist besonders wichtig, um die experimentell erhaltenen Daten korrekt zu interpretieren.

Unter Bedingungen, in denen der *steady-state* Symport inhibiert ist, wird eine schnelle *pre steady-state* Ladungsverschiebung detektiert, die dem elektrogenen *induced fit* des Zuckermoleküls zugeordnet wird ([Seite 106, Abbildung 36](#); [Seite 108, Abbildung 37](#)). Wahrscheinlich wird die Bewegung von Helix-Dipolen oder die Reorientierung von Wassermolekülen infolge der Zuckerbindung beobachtet. Die *steady-state* Elektrogenität im Symport- und Antiport-Modus ([Seite 102, Abbildung 34](#); [Seite 124, Abbildung 45](#)) sowie die *pre steady-state* Ladungsverschiebung mit negativer Amplitude für pH-Werte  $> pK_b$  in GlcP ([Seite 118, Abbildung 41](#)) können durch dieselbe elementare elektrogene Reaktion erklärt werden. Es handelt sich um den Transfer der negativ geladenen Protonenbindestelle, entweder im leeren Carrier (Symport) oder im Zucker-gebundenen, unprotonierten Carrier (Antiport und Uniport bei  $pH > pK_b$ ). Diese Zuordnungen sind durch zahlreiche experimentelle Evidenzen abgesichert. Die zugrundeliegenden Überlegungen sind in diesem Abschnitt zusammengefasst und diskutiert.

### **Der Transfer der negativ geladenen Protonenbindestelle ist elektrogen**

Im *steady-state* Symport dominiert eine elektrogene Reaktion, die in wt Transportern das *pre steady-state* Signal in einem weiten pH-Bereich überdeckt ([Seite 106, Abbildung 36](#)). Der *steady-state* konnte gut charakterisiert werden. Dennoch sind die gefundenen Parameter Charakteristika des ratenlimitierenden Schrittes im *steady-state*, nicht der entsprechenden elektrogenen Reaktion, die unter keinen Bedingungen isoliert betrachtet werden konnte.

#### ***Der leere Carrier bestimmt die Elektrogenität im Symport-Modus***

In der Literatur sind für LacY die Protonenfreisetzung und die Konformationsänderung des leeren Carriers als mögliche ratenlimitierende Reaktionen im Zuckergradienten-getriebenen *steady-state* Symport beschrieben. Dies ist kompatibel mit der gefundenen pH-Abhängigkeit im SSM-Experiment ([Seite 102, Abbildung 34](#)). Es ist ebenfalls beschrieben, dass die ratenlimitierende Reaktion im Zucker-getriebenen Transport unter Einfluss eines Membranpotentials beschleunigt wird, bis eine Zucker-abhängige Reaktion ratenlimitierend wird ([Seite 25f](#)). Ein Membranpotential kann nur dann zur Beschleunigung der Umsatzrate führen, wenn die ratenlimitierende Reaktion auch elektrogen ist. Damit müssen entweder Protonenfreisetzung oder die Konformationsänderung des leeren Carriers für die Elektrogenität im *steady-state* Symport verantwortlich sein.

Es bleibt die Frage, ob die Protonenfreisetzung selbst oder die Konformationsänderung des leeren Carriers die Elektrogenität im *steady-state* ausmachen. Eine Ladungstrennung an sich, also die Deprotonierung, ist elektrophysiologisch nicht messbar (Seite 29f). Eine Protonenfreisetzung kann aber dann elektrogen sein, wenn sie die Bewegung des Protons entlang eines Kanals beinhaltet, der von der wässrigen Umgebung abgeschirmt ist. So würde das Proton entlang einer dielektrischen Distanz verschoben. Die 3D-Strukturen der Transporter zeigen jedoch, dass die Protonenbindestellen meist in direktem Kontakt mit der hydrophilen Kavität stehen. Damit bleibt nur die Konformationsänderung des leeren Carriers als elektrogene Reaktion im *steady-state* Symport.

### ***Der beladene Carrier bestimmt die Elektrogenität in wt GlcP bei $pH > pK_b$***

Diese Zuordnung ist auch konsistent mit der Interpretation der *pre steady-state* Signale in wt GlcP für pH-Werte  $> pK_b$  (Seite 118, Abbildung 41). Oberhalb des  $pK_b$ -wertes ändert sich das Vorzeichen der *pre steady-state* Reaktion. Es resultiert eine Ladungsverschiebung mit negativem Vorzeichen, weil der Carrier deprotoniert ist.

Der Ladungstransfer im Zuge der Konformationsänderung von  $P_{out}S$  zu  $P_{in}S$  ist derselbe wie der Ladungstransfer in der Konformationsänderung von  $P_{in}$  zu  $P_{out}$ , welche in den *E.coli* Transportern für die *steady-state* Elektrogenität verantwortlich ist (siehe oben). In GlcP wird die negativ geladene Protonenbindestelle während der Konformationsänderung des beladenen Carriers von außen nach innen transferiert. Das Resultat ist ein *pre steady-state* Signal mit negativem Vorzeichen. Während des *steady-state* Symports findet genau die entgegengesetzte Reaktion statt. Die negativ geladene Protonenbindestelle wird während der Konformationsänderung des leeren Carriers von innen nach außen transferiert, was zu einem *steady-state* Signal mit positivem Vorzeichen führt.

Eine wichtige Schlussfolgerung dieser Überlegung ist, dass das *pre steady-state* Signal mit negativer Amplitude in wt GlcP damit strikt von dem *pre steady-state* Signal mit positiver Amplitude zu unterscheiden ist. Es handelt sich um zwei verschiedene Reaktionen, nicht um dieselbe Reaktion, die in entgegengesetzte Richtung erfolgt. Das *pre steady-state* Signal mit negativem Vorzeichen entspricht dem Transfer der negativ geladenen Protonenbindestelle. Die entsprechende *pre steady-state* Ladungsverschiebung entspricht daher genau einer Elementarladung pro Transporter. Der  $pK_b$ -wert, mit dem sich das Vorzeichen des *pre steady-state* Signals umkehrt, konnte der Protonenbindestelle (D22) zugeordnet werden: Die Signale in D22N GlcP sind pH-unabhängig und zeigen immer eine positive Amplitude (Seite 119, Abbildung 42). Das *pre steady-state* Signal positiver Amplitude kann aber selbsterklärend nicht der Verschiebung einer neutralisierten Protonenbindestelle entsprechen.

Es ist anzumerken, dass diese Vorzeichenumkehr bei pH-Werten  $> pK_b$  in den *E.coli* Transportern nicht beobachtet wird (Seite 106, Abbildung 36), weil die Konformationsänderung  $P_{out}S$  zu  $P_{in}S$  hier nicht stattfindet. Im Gegensatz zu den *E.coli* Transportern katalysiert wt GlcP Uniport im unprotonierten Carrier (Seite 125, Abbildung 46), sodass diese Konformationsänderung nur in GlcP beobachtet werden kann.

Wenn GlcP tatsächlich im unprotonierten Zustand unter den gegebenen experimentellen Bedingungen an der SSM Uniport katalysiert, muss gefragt werden weshalb ein elektrogener *pre steady-state* überhaupt detektiert wird. Die Ladungsverschiebung im unprotonierten beladenen Carrier und die im leeren Carrier müssten sich im *steady-state* Uniport gegenseitig aufheben. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Konformationsänderung des (negativ geladenen) leeren Carriers wie in den *E.coli* Transportern ratenlimitierend für den Zucker-getriebenen Symport ist. Messungen mit radioaktiv markierten Substraten zeigen, dass die Umsatzrate unter physiologischen Bedingungen in GlcP [133] mit 160 nmol/mg/min ( $cs \gg KD$ ) niedriger ist als die des *E.coli* Transporters LacY (600 nmol/mg/min,  $cs \approx KD$ ) [73, 280]. Für LacY wurde die Ratenkonstante der Konformationsänderung des leeren Carriers zu etwa  $50 s^{-1}$  als ratenlimitierend bestimmt [165–167]. Für GlcP ist die entsprechende Ratenkonstante daher wahrscheinlich viel niedriger als die des beladenen Carriers mit etwa  $200 s^{-1}$  (Seite 107, Tabelle 20). Der Ladungstransfer mit entgegengesetztem Vorzeichen erfolgt damit wesentlich langsamer, weshalb es nicht zur Auslöschung der *pre steady-state* Elektrogenität kommt.

### **Die Elektrogenität im *induced fit* des Zuckermoleküls ist nicht konserviert**

Bei der *pre steady-state* Reaktion mit meist positiver Amplitude handelt es sich um eine frühe Zucker-induzierte Ladungsverschiebung. Nur in D46N FucP (Seite 12, Abbildung 66) und für D-Glucose an D27N XylE bei  $pH > 8,5$  (Seite 130, Abbildung 48) zeigt diese Reaktion ein negatives Vorzeichen mit geringer Amplitude. Diese Reaktion wird in wt *E.coli* Transportern detektiert, wenn der *steady-state* inhibiert ist ( $pH < pK_a$  oder  $pH > pK_b$ ; Seite 106, Abbildung 36) sowie über den gesamten pH-Bereich der OE-Mutanten (Seite 108, Abbildung 37; Seite 119, Abbildung 42). Darüber hinaus tritt sie auch in wt GlcP bei  $pH < pK_b$  auf (Seite 118, Abbildung 41). Es muss sich um eine Reaktion nach der Konformationsänderung des leeren Carriers handeln, da die Konformationsänderung des leeren Carriers in LacY signifikant langsamer (ca.  $50 s^{-1}$  [165–167]) als die detektierte Reaktion ist ( $> 300 s^{-1}$ , Seite 107, Tabelle 20). Die elektrogene *pre steady-state* Reaktion muss demnach eine andere Ursache haben als den Transfer der negativ geladenen Bindestelle im Zuge der Konformationsänderung  $P_{in}$  zu  $P_{out}$  (siehe oben).

Insgesamt sind die Ratenkonstanten dieser Reaktion bei allen Transportern, in wt sowie OE-Mutanten relativ ähnlich, wobei wt GlcP im protonierten Zustand mit  $90 \text{ s}^{-1}$  die langsamste Ratenkonstante und die *E.coli* Transporter wahrscheinlich alle mit  $> 300 \text{ s}^{-1}$  Ratenkonstanten oberhalb der Detektionsgrenze aufweisen ([Seite 107, Tabelle 20](#)). In LacY und MelB konnte diese Reaktion mit einer spektroskopisch beobachteten Konformationsänderung in Verbindung gebracht werden [[205, 214](#)]. So induziert die Zuckerbindung eine Konformationsänderung im Transporter, die mit einer elektrogenen Reaktion einhergeht.

### **Die vier Transporter zeigen unterschiedliche Ladungsverschiebungen**

Die negative *pre steady-state* Ladungsverschiebung für pH-Werte  $> \text{pKb}$  in wt GlcP (siehe [oben](#)) ermöglicht eine Kalibrierung für die *pre steady-state* Ladungsverschiebungen verschiedener Transporter auf der SSM. So müsste die Verschiebung der negativ geladenen Protonenbindestelle genau einer Elementarladung pro Transporter entsprechen. Im Zuge der *pre steady-state* Reaktion im sauren pH-Bereich wird eine positive Ladung, etwa  $+ 12 \text{ pC}$ , in Richtung Sensor verschoben. Ist der Transporter im basischen pH-Bereich negativ geladen, so erfolgt zusätzlich die Verschiebung einer negativen Elementarladung ([Seite 118, Abbildung 41](#)). Diese Elementarladung entspricht dann  $24,5 \pm 4 \text{ pC}$ , also näherungsweise  $25 \text{ pC}$ . Es handelt sich um die Differenz der *pre steady-state* Ladungsverschiebung im sauren ( $+ 11,8 \text{ pC}$ ) und der *pre steady-state* Ladungsverschiebung im basischen ( $- 12,7 \text{ pC}$ ). Diese Überlegung basiert auf folgenden Ergebnissen.

- (1) Die *pre steady-state* Ladungsverschiebung in D22N GlcP ist pH-unabhängig ([Seite 119, Abbildung 42](#)), weshalb der *induced fit* bei allen pH-Werten dieselbe Ladung transferiert.
- (2) Die negative Ladung in wt GlcP wird vollständig über die Membran transferiert. Dass es sich nicht um eine Teilreaktion handelt, bestätigt die Zuckerfreisetzung, die in radioaktiven Transportassays gezeigt wurde ([Seite 125, Abbildung 46](#)).

Die absoluten Ladungsverschiebungen in den vier untersuchten Transportern unterscheiden sich signifikant voneinander ([Seite 107, Tabelle 20](#)). Sie können im physiologischen pH-Bereich unterhalb der Detektionsgrenze liegen ( $< 0,1 \text{ pC}$ , D46N FucP) ([Seite A12, Abbildung 66](#)), aber auch bis zu 50 % einer Elementarladung ausmachen ( $12 \text{ pC}$ , wt GlcP). E325A LacY transferiert eine Ladung von etwa  $3 \text{ pC}$  bzw.  $(13 \pm 7) \%$  einer Elementarladung, während D27N XylE etwa  $7 \text{ pC}$  bzw.  $(28 \pm 6) \%$  einer Elementarladung verschiebt. Für LacY wurde zuvor ermittelt, dass die *pre steady-state* Reaktion etwa  $6 \%$  einer Elementarladung ausmacht [[205](#)], was diesem Vergleich sehr nahe kommt. Große Unterschiede in den Ladungsverschiebungen deuten darauf hin, dass die Bewegung der Ladungsträger während des *induced fits* in den verschiedenen Transportern nicht konserviert ist.

Wenn etwa 25 pC einer Elementarladung entspricht, kann auch die Anzahl funktionaler Transporter pro Sensor berechnet werden. Auf der SSM tragen damit etwa  $10^8$  funktionale Transporter zum detektierten Signal bei ([Gleichung G62](#)).

$$\frac{25 \cdot 10^{-12} \text{ C}}{1,6 \cdot 10^{-19} \text{ C}} = 150 \cdot 10^6 \text{ Transporter} \quad \text{G62}$$

### **Die pre steady-state Reaktion ist eine frühe im Reaktionszyklus**

Als Zucker-induzierte elektrogene Reaktion könnte ein *induced fit*, die Schließung der Kavität oder die gesamte Konformationsänderung des beladenen Carriers verstanden werden. Garcia-Celma et al. interpretierte die *pre steady-state* Ladungsverschiebung als Substrat-Okklusion bzw. als Bildung eines okkludierten Zustands [\[163\]](#) ([Seite 24, Abbildung 10](#)).

Messungen an GlcP lieferten einen hilfreichen Beitrag zur Aufklärung der Natur der beobachteten elektrogenen Reaktion. Das *pre steady-state* Signal negativer Ladung in wt GlcP bei pH-Werten  $> \text{pKb}$  ([Seite 118, Abbildung 41](#)) konnte der Konformationsänderung von  $\text{P}_{\text{out}}\text{S}$  zu  $\text{P}_{\text{in}}\text{S}$  zugeordnet werden (siehe [oben](#)). Gleichzeitig wird diese Vorzeichenumkehr im *pre steady-state* Signal der *E.coli* Transporter für pH-Werte  $> \text{pKb}$  nicht beobachtet ([Seite 106, Abbildung 36](#)). Die mit dem Signal negativer Amplitude korrelierende Konformationsänderung findet in LacY, FucP und XylE also nicht statt. Dennoch bleibt die *pre steady-state* Reaktion positiver Amplitude bei pH-Werten  $> \text{pKb}$  erhalten ([Seite 106, Abbildung 36](#)). Der Zucker bindet an den negativ geladenen Carrier, wird aber nicht transportiert. Die *pre steady-state* Reaktion muss demnach mit einer Reaktion vor der Konformationsänderung des beladenen Carriers korrelieren.

Diese Zuordnung wird auch durch die hohen Ratenkonstanten des *pre steady-state* Signals bestätigt. Es ist anzumerken, dass für den Transport von D-Lactose in LacY zwar eine Ratenkonstante für die Konformationsänderung des beladenen Carriers von  $250 \text{ s}^{-1}$  angenommen wurde [\[163\]](#). Für sekundäre Substrate muss diese Ratenkonstante jedoch sehr wahrscheinlich erheblich niedriger sein. Dies ist ausführlich auf [Seite 168f](#) diskutiert. So wird für den Transport sekundärer Substrate eine Reaktion im Zuckertranslokationsweg ratenlimitierend ([Seite 85, Tabelle 15](#)). Sekundäre Substrate werden mit einer niedrigeren Umsatzrate transportiert als D-Lactose mit  $30 \text{ s}^{-1}$  [\[73\]](#). Gleichzeitig ist die elektrogene *pre steady-state* Reaktion für alle Substrate mit  $> 300 \text{ s}^{-1}$  gleich schnell ([Seite 88, Abbildung 29; Seite 107, Tabelle 20](#)). Die *pre steady-state* Reaktion muss also vor der Konformationsänderung des beladenen Carriers stattfinden.

In der Literatur wird als ratenlimitierende Reaktion im Zuckertranslokationsweg die Bildung des okkludierten Zustands angenommen [\[144, 146\]](#) ([Seite 171, Abbildung 56](#)). Die Bildung und der Zerfall des okkludierten Zustands sind im 6-Zustands-Modell ([Seite 61, Abbildung 18](#)) und im 8-Zustands-

Modell (Seite 150, Abbildung 54) als Konformationsänderung des beladenen Carriers zusammengefasst worden. Das Energiediagramm in Abbildung 58 (Seite 175) macht deutlich, weshalb die Bildung des okkludierten Zustands nicht für die elektrogene Reaktion verantwortlich sein kann, wie in Garcia-Celma et al. angenommen wird. Dies würde zum einen zu asymmetrischen Bindungseigenschaften führen. Zum anderen wäre der okkludierte Zustand kein hochenergetisches Intermediat mehr. Beides widerspricht dem Energiediagramm nach Madej et al. und den zugrunde liegenden experimentellen Daten [144, 146].

Diese Überlegungen ermöglichen die Zuordnung der Ladungsverschiebung mit meist positivem Vorzeichen zu einem schnellen *induced fit* des Zuckermoleküls vor der Bildung des okkludierten Zustands. Interessanterweise wurde eine Reaktion mit einer ähnlichen Kinetik in der Literatur bereits beobachtet. Der schnellen Bindung von NPG an LacY folgt eine Konformationsänderung mit einer Ratenkonstante von  $250 \text{ s}^{-1}$  [168], obwohl für NPG nach Madej et al. [144, 146] die Substrat-Okklusion die Umsatzrate von  $< 30 \text{ s}^{-1}$  limitieren muss. Die der NPG-Bindung folgende Reaktion könnte daher mit dem auf der SSM beobachteten elektrogenen *induced fit* korrelieren.

Es ist anzumerken, dass die Existenz der schnellen *pre steady-state* Reaktion in gewisser Weise Daten aus der Literatur widerspricht. So wurde gezeigt, dass die Zuckerbindung limitiert ist durch die Öffnung der periplasmatischen Kavität, die mit einer Ratenkonstante von etwa  $50 \text{ s}^{-1}$  erfolgt [165–167]. Diese Experimente wurden neben den Kristallstrukturen, die vermehrt in der einwärtsgerichteten Konformation gelöst wurden (Seite 21, Tabelle 3), dazu verwendet einen einwärtsgerichteten Grundzustand bzw. Anfangszustand für LacY zu postulieren. Dass der Zucker eine schnelle Reaktion mit einer Ratenkonstante von  $> 300 \text{ s}^{-1}$  induziert lässt sich nur schwer mit diesen Überlegungen vereinen. Möglicherweise sind die Transporter in Proteoliposomen nicht perfekt orientiert oder der Anfangszustand ist entgegen der Annahmen nicht asymmetrisch.

### **Interner Protonentransfer oder Bewegung geladener Aminosäuren**

Die Elektrogenität des *induced fits* könnte generell auf verschiedene Prozesse zurückgeführt werden:

- (1) Bewegung eines Protons bzw. interner Protonentransfer
- (2) Partielle Verschiebung ionisierter Seitenketten
- (3) Neigen von Helices und damit verbundene Bewegung von Helix-Dipolen
- (4) Änderung der dielektrischen Umgebung von Ladungsträgern durch Bewegung von Wassermolekülen innerhalb der Kavität

Eine interne Protonentransferreaktion wurde infolge der Zuckerbindung aufgrund eines KIE gefunden [176]. Dass es sich bei der elektrogenen *pre steady-state* Reaktion nicht um eine interne Protonentransferreaktion handeln kann, zeigt das Fehlen eines KIE bei den Signalen der

OE-Mutanten ([Seite 100](#), [Abbildung 32](#)). Zudem kann es sich nicht um die Bewegung des zu transportierenden Protons handeln. Für LacY und XylE sind die absoluten Ladungsverschiebungen der *pre steady-state* Reaktion in den OE-Mutanten vergleichbar mit denen im wt, obwohl die Mutanten keine Protonentranslokation katalysieren. Auch die Tatsache, dass sich die absoluten Ladungsverschiebungen der *pre steady-state* Reaktion bei Vergleich der einzelnen Transporter extrem unterscheiden (siehe [oben](#)), spricht gegen einen internen Protonentransfer, dessen Ladungsverschiebung sehr wahrscheinlich für alle Transporter ähnlich wäre.

Um die Ursache der Ladungsverschiebung einzugrenzen, kann die Elektrogenität von Mutanten betrachtet werden, denen einzelne, geladene Aminosäure fehlen. OE-Mutanten, bei denen die negativ geladene Protonenbindestelle mit einer neutralen Aminosäure substituiert ist, zeigen weiterhin die Zucker-induzierte Ladungsverschiebung mit einer positiven Amplitude, die für alle pH-Werte mit denen im wt vergleichbar ist ([Seite 108](#), [Abbildung 37](#)). Dies ist für pH-Werte  $< pK_a$  eine triviale Beobachtung, da die Protonenbindestelle in den wt Transportern ohnehin neutralisiert ist, wenn der Zucker bindet. Sowohl im wt als auch in der OE-Mutante trägt die entsprechende Aminosäure bei Zuckerbindung keine Ladung. Bei pH-Werten  $> pK_b$  sind die wt Transporter jedoch unprotoniert, haben also eine negativ geladene Protonenbindestelle. Dennoch bleibt die *pre steady-state* Reaktion in ihrer Ladung auch bei pH-Werten  $> pK_b$  unbeeinflusst. Dieser Vergleich zeigt, dass die negative Ladung der Protonenbindestelle, die sich vom Sensor weg bewegen könnte, nicht zum *pre steady-state* Signal positiver Amplitude beiträgt.

Als geladene, transmembranständige Aminosäuren, die in der Nähe der Protonenbindestelle lokalisiert sind, fällt ein Arginin auf, das in LacY (R302), XylE (R133) und GlcP (R102) konserviert ist, aber nicht in FucP vorkommt. Da das *pre steady-state* Signal von FucP im physiologischen pH-Bereich unterhalb der Detektionsgrenze liegt ([Seite A12](#), [Abbildung 66](#)), festigte sich die Vermutung die Bewegung des Arginin könnte die Hauptursache für die *pre steady-state* Reaktion darstellen. R302A LacY hingegen zeigt auch eine *pre steady-state* Ladungsverschiebung [\[281\]](#), die in ihrer Abklingzeit und Amplitude vergleichbar ist mit der des wt und E325A LacY.

Zwei transmembranständige Ladungsträger, die Protonenbindestelle und das Arginin, konnten damit als Ursache für die *pre steady-state* Ladungsverschiebung ausgeschlossen werden. Da in LacY, GlcP und XylE nur diese beiden transmembranständigen Ladungsträger konserviert sind ([Tabelle 28](#)) und Oberflächenladungen keinen Effekt auf die Elektrogenität haben können (Erläuterung hierzu auf [Seite 29f](#)), kann nicht die Bewegung einzelner, konservierter Aminosäuren für das *pre steady-state* Signal verantwortlich sein. Als mögliche Ursachen für das *pre steady-state* Signal bleiben gemäß der Auflistung [oben](#) die Bewegung von Helix-Dipolen und die Reorientierung von Wassermolekülen.

**Tabelle 28:** Liste geladener Aminosäuren innerhalb der TMDs für alle untersuchten Transporter. Als konservierte transmembranständige Aminosäuren wurden lediglich die Protonenbindestelle (rot) und ein Arginin (blau) identifiziert.

Transporter	Ladungsträger in der TMD
LacY	<b>E325, R302</b> , E269, E126, D237, D240, R144, K319, K358
FucP	<b>D46</b> , E135
XylE	<b>D27, R133</b> , E206
GlcP	<b>D22, R102</b>

### ***Es handelt sich um einen kollektiven Effekt***

Der Grad der Ladungsträgerbewegung wird durch den pH-Wert und die Substrat-Spezies moduliert. Es ist auffällig, dass sekundäre Substrate in Sättigungskonzentrationen andere, meist geringere Ladungsverschiebungen induzieren als die Hauptsubstrate ([Seite 87, Tabelle 16](#)). Da verschiedene Zucker keine Ladungen zur beobachteten Reaktion beitragen, kann die Änderung der Ladungsverschiebung auf eine Veränderung der Bewegung der Ladungsträger während des *induced fits* zurückgeführt werden. Die Ladungsverschiebungen korrelieren nicht mit der Bindungsaffinität. Eine geringere Ladungsverschiebung ist demnach nicht gleichbedeutend mit einer schlechteren Bindung, sondern lediglich mit einem alternativen Intermediat im Reaktionszyklus, also unterschiedlichen Positionen der Ladungsträger nach dem *induced fit*. Diese Interpretation ist auch mit der Beobachtung kompatibel, dass verschiedene Substrate andere Transporter-Zustände induzieren. Deutlich wird dies bei Betrachtung der Interaktionsnetzwerke verschiedener 3D-Strukturen ([Seite A10, Abbildung 65](#)).

Die pH-Abhängigkeit der *pre steady-state* Reaktion in den OE-Mutanten zeigt einen linearen Verlauf, der je nach Transporter eine positive oder negative Steigung haben kann ([Seite 108, Abbildung 37](#)). Diese pH-Abhängigkeit kann nicht durch einen direkten Einfluss sich verändernder Ladungen im Protein erklärt werden, da die pH-Abhängigkeit dann einer oder mehrerer Titrationskurven ähneln müsste und nicht linear verlaufen kann. Wahrscheinlich beeinflussen Oberflächenladungen im Lipid oder Transporter die Ladungsverschiebungen während des *induced fits* auf eine ähnliche Weise wie auch für verschiedene Substrate beobachtet. Auch dies stützt die Überlegung, dass die *pre steady-state* Reaktion keine Bewegung einzelner geladener Aminosäuren repräsentiert, da sonst die pH-Abhängigkeit einer Titrationskurve folgen müsste.

Interessanterweise wird bei pH 8,5 kein D-Glucose-induziertes Signal mit D27N XylE detektiert. Und zwar nicht, weil die Reaktion mit dem pH-Wert langsamer wird, wie die pH-unabhängigen Abklingzeiten der Signale zeigen ([Seite 130, Abbildung 48](#)), sondern weil die Ladungsverschiebung selbst null wird. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei der pH-abhängigen Änderung der Ladungsverschiebung um eine Änderung der dielektrischen Distanz einer Vielzahl von

Ladungsträgern handelt. Die Verschiebungen der geladenen Reste heben sich unter diesen Bedingungen gegenseitig elektrisch auf.

Der Einfluss der Substrate und des pH-Wertes auf die Ladungsverschiebung im *pre steady-state* ist kompatibel mit der Interpretation, dass mit der *pre steady-state* Reaktion ein kollektiver Effekt beobachtet wird. Möglicherweise handelt es sich um die Bewegung von Helix-Dipolen oder eine Verdrängung von Wassermolekülen innerhalb der Kavität. Der genaue Ursprung der Ladungsverschiebung kann nicht festgemacht werden. Was lässt sich sicher über die *pre steady-state* Ladungsverschiebung sagen? Sie kommt in allen Transportern vor, sowohl im wt als auch in den OE-Mutanten. Und sie korreliert nicht mit der Zuckertranslokation, sondern mit einer Reaktion davor, die als *induced fit* verstanden werden kann. Aus diesem Grund eignet sie sich für Messungen der Zuckerbindung.

Eine quantitative Betrachtung der Ladungsverschiebungen verschiedener Transporter liefert jedoch keine Erkenntnisse, da die messbare Elektrogenität des *induced fits* von verschiedenen Faktoren abhängig ist; darunter die Anzahl und Ladung beteiligter Ladungsträger sowie die Richtung und Distanz der Ladungsträgerbewegung. Außerdem sind der Anfangszustand des Transporters und damit auch möglicherweise die Orientierung der Transporter in den Proteoliposomen ausschlaggebend für die Detektion des *pre steady-state* Signals. Nur Transporter im auswärtsgerichteten Zustand können zur schnellen Ladungsverschiebung beitragen, da die Konformationsänderung des leeren Carriers langsam ist. Unterschiede in der Ladungsverschiebung zwischen einzelnen Transportern erlauben daher keine konkreten Rückschlüsse. Möglicherweise deutet eine geringe Elektrogenität darauf hin, dass der Grad der Helix-Neigung im Zuge des *induced fits* verändert ist. Genauso gut könnte der Anfangszustand zwischen den Transportern unterschiedlich sein.

### **Ladungsbilanz im *steady-state* Symport**

Während eines Transportzyklus im Symport-Modus muss genau eine Elementarladung pro Reaktionszyklus über die Membran transferiert werden. Dies erfolgt während der Konformationsänderung des leeren Carriers. Hier wird die negativ geladene Protonenbindestelle nach der Dissoziation des Protons von innen nach außen über die Membran transferiert. Während der Konformationsänderung des beladenen Carriers ist diese aufgrund des zu transportierenden Protons neutralisiert, sodass kein Ladungstransfer stattfindet.

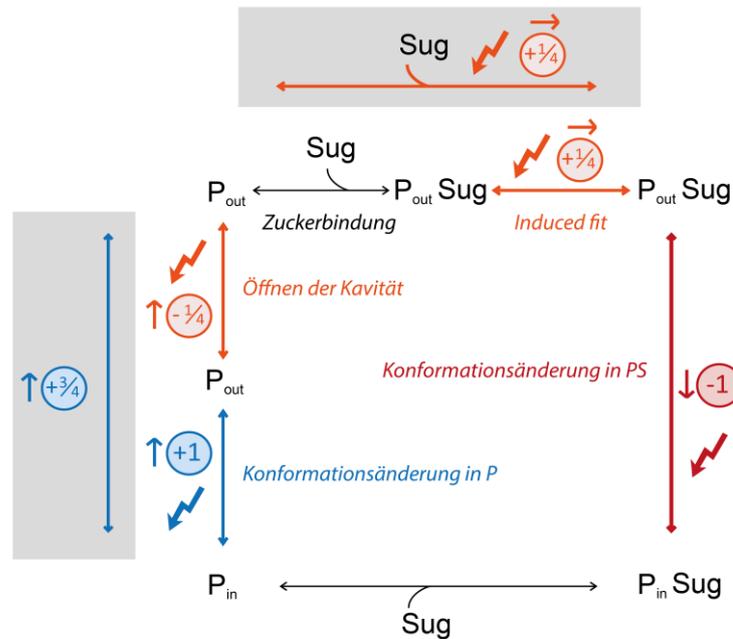
Die beobachtete, elektrogene *induced fit* Reaktion kann nicht zum Nettoladungstransfer während eines Reaktionszyklus beitragen. So muss eine elektrogene Reaktion im Transportzyklus existieren, die genau die zum *induced fit* entgegengesetzte Ladungsverschiebung bewirkt. Der *induced fit* kann

zum besseren Verständnis als Zucker-induzierte Schließung des beladenen Carriers betrachtet werden. Er ist für das *pre steady-state* Signal mit meist positiver Ladung verantwortlich. Im *steady-state* erfolgt dann zusätzlich die genau entgegengesetzte Reaktion. Nach der Konformationsänderung des leeren Carriers, die genau eine Elementarladung über die Membran transferiert, erfolgt das Öffnen der Kavität, welche die zur *pre steady-state* Reaktion äquivalente negative Ladung transferiert. Die sich im Zuge des *induced fits* bewegend geladenen Proteinsegmente bewegen sich hier in die entgegengesetzte Richtung.

Die positive Ladung des *induced fits* liegt wie *oben* beschrieben abhängig vom Transporter und Substrat zwischen < 1 % (FucP) und 50 % (GlcP) einer Elementarladung, sodass sie im Mittel mit 25 % einer Elementarladung angenommen werden könnte. Die Konformationsänderung des leeren Carriers und das elektrogene Öffnen der periplasmatischen Kavität können experimentell nicht isoliert voneinander betrachtet werden. Im 8-Zustands-Modell (*Seite 150, Abbildung 54*) werden daher die Konformationsänderung des leeren Carriers und das anschließende Öffnen der periplasmatischen Kavität im leeren Carrier zu einer elektrogenen Reaktion zusammengefasst. Diese Reaktion wird als Konformationsänderung des leeren Carriers bezeichnet und transferiert dann eine negative Elementarladung abzüglich der positiven *pre steady-state* Ladung für das Öffnen der periplasmatischen Kavität, also im Mittel etwa 75 % einer Elementarladung. Die Konformationsänderung in PS, die für Antiport und Uniport in wt GlcP charakteristisch ist, transferiert im 8-Zustands-Modell genau eine Elementarladung.

In *Abbildung 55* sind die Ladungsbilanzen im 8-Zustands-Modell für den äußeren Reaktionszyklus, also für die Reaktionen im permanent unprotonierten Carrier veranschaulicht. Im permanent protonierten Carrier sind die Ladungsverschiebungen des *induced fits* und der Öffnung der Kavität identisch zu denen im unprotonierten Carrier (*Abbildung 55, orange*). Die Konformationsänderungen in PH und PHS, welche die neutralisierte Protonenbindestelle transferieren, sind dagegen elektroneutral statt wie im unprotonierten Carrier (P und PS) genau eine Elementarladung zu transferieren (*Abbildung 55, rot, blau*).

Es ist auch ersichtlich, dass die elektrogene Reaktion mit der größten Ladungsverschiebung in diesem Modell weiterhin die Konformationsänderung des leeren Carriers darstellt, sodass die Potential-Abhängigkeit im *steady-state* durch die Ladung im leeren Carrier vermittelt wird. Im MKM ist dementsprechend lediglich die Elektrogenität des leeren Carriers berücksichtigt (*Seite 61, Abbildung 18*). Eine Ausnahme ist GlcP: Hier transferiert das Schließen und Öffnen der Kavitäten genau 50 % einer Elementarladung, sodass die Elektrogenität des *induced fits* und der Konformationsänderung des leeren Carriers mit 0,5 e identisch sind.



**Abbildung 55: Ladungsbilanz der elektrogenen Teilreaktionen im äußeren Reaktionszyklus des 8-Zustands-Modells.** Es ergibt sich der Transportzyklus für Uniport im permanent unprotonierten Carrier, wie er in wt GlcP unter extremen Bedingungen beobachtet werden könnte. Grau hinterlegt sind die zusammengefassten Reaktionen, wie sie im 8-Zustands-Modell (Seite 150, Abbildung 54) berücksichtigt sind. Die Konformationsänderungen in P (blau) und PS (rot) transferieren genau eine Elementarladung, die der negativ geladenen Protonenbindestelle. Das Öffnen und Schließen der Kavität (orange) transferiert im Mittel bei allen Transportern  $\pm 0,25$  e. Im permanent protonierten Carrier sind die orange markierten Ladungsverschiebungen unbeeinflusst, während die Konformationsänderungen in PH und PHS elektroneutral sind.

## Die ratenlimitierende Reaktion im Symport ist abhängig von pH, Zuckersubstrat und Potential

Für LacY wurde bereits 1988 ein kinetisches Modell beschrieben, das zwei Protonenbindestellen berücksichtigt: Eine periplasmatische Aufnahmeseite mit einem hohen pK-Wert und eine zytoplasmatische Abgabeseite mit einem niedrigeren pK-Wert [282]. Dabei beeinflusst die Protonierung die Affinität zum Zucker, während die Protonenfreisetzung als ratenlimitierend für den Potential-getriebenen Uptake beschrieben wird. In den folgenden Jahrzehnten findet man für LacY nicht mehr die Protonenfreisetzung, sondern die Zuckerfreisetzung [124] oder die Öffnung der periplasmatischen Kavität [125] als ratenlimitierende Reaktionen für Potential-getriebenen Uptake beschrieben.

Eine zentrale Fragestellung für das Verständnis des Transportmechanismus ist die nach der ratenlimitierenden Reaktion. Da die einzelnen Reaktionen im Transportzyklus unterschiedliche Abhängigkeiten von den äußeren Bedingungen zeigen, kann sich bei Veränderung des Zuckersubstrats, der Substratkonzentration, des pH-Wertes oder des Membranpotentials die ratenlimitierende Reaktion verändern. Dieser Abschnitt klärt systematisch welche Reaktionen unter verschiedenen äußeren Bedingungen ratenlimitierend sein können. Dabei wird der

einwärtsgerichtete PMF-gekoppelte Symport-Modus betrachtet (MKM) und die übrigen Reaktionszyklen im 8-Zustands-Modell der Einfachheit halber nicht berücksichtigt.

Das Experiment zeigt, dass niedrige Zuckerkonzentrationen ([Seite 81, Abbildung 26](#)) und saure pH-Werte ([Seite 102, Abbildung 34](#)) die Umsatzrate reduzieren. Dabei kann entweder über das vorgelagerte Bindungsgleichgewicht die entsprechende ratenlimitierende Konformationsänderung verlangsamt werden oder die Bindungsreaktionen selbst werden ratenlimitierend. Im MKM wurde das Szenario der schnellen Bindungsgleichgewichte gewählt ([Seite 61, Abbildung 18](#)). Die Bindungsreaktionen sind als schnelle Gleichgewichte mit den Gleichgewichtskonstanten  $K_D$  und  $pK_i$  definiert. Sie beeinflussen als solche die effektiven Raten der Konformationsänderungen und können selbst unter keinen Umständen ratenlimitierend werden. Im MKM führen niedrige Zuckerkonzentrationen außerhalb der Zelle und saure pH-Werte innerhalb der Zelle dazu, dass die Konzentrationen der Transporter-Populationen  $P_{outHS}$  bzw.  $P_{in}$  verringert sind. Dadurch werden die effektiven Raten der Konformationsänderungen des beladenen (von außen nach innen) bzw. leeren Carriers (von innen nach außen) reduziert und so die Umsatzrate im einwärtsgerichteten *steady-state* Symport beeinflusst. Bindungsreaktionen können aber unter extremen Bedingungen auch selbst ratenlimitierend werden, was im MKM nicht berücksichtigt ist.

### **Unterhalb des pKa-Wertes definiert der leere Carrier die Umsatzrate**

Die Ratenkonstante der Konformationsänderung des leeren Carriers wurde für LacY direkt bestimmt und liegt mit etwa  $50 \text{ s}^{-1}$  im Bereich der Umsatzrate von LacY [[165–167](#)]. Sie wird daher oft als ratenlimitierende Reaktion im Transportzyklus angenommen wie auf [Seite 25f](#) ausführlich beschrieben. Aus dem langsamen *pre steady-state* Signal der Reaktion von D-Glucose mit wt XylE ([Seite 78, Abbildung 25](#)), kann direkt die Ratenkonstante der Konformationsänderung nach der Deprotonierung innen bestimmt werden. Die Abklingzeiten des Signals liegen zwischen  $(39 \pm 9) \text{ s}^{-1}$  (pH 9,0) und  $(12 \pm 3) \text{ s}^{-1}$  (pH 4,5) ([Seite 129, Abbildung 47](#)), in guter Übereinstimmung mit der Ratenkonstante für die Konformationsänderung des leeren Carriers in LacY.

Das pH-Profil zeigt für jeden Transporter einen spezifischen pKa-Wert, sodass hohe Protonenkonzentrationen die Umsatzrate im Symport-Modus reduzieren ([Seite 102, Abbildung 34a](#)). Der pKa-Wert konnte der Protonenfreisetzung in der einwärtsgerichteten Konformation zugeordnet werden. Messungen mit pH-Gradienten haben gezeigt, dass die mit dem pKa-Wert korrelierende Inhibition im sauren pH-Bereich abhängig vom intraliposomalen pH-Wert und unabhängig vom äußeren pH-Wert ist. Im Experiment wurde der äußere pH-Wert konstant gehalten und der zuvor eingestellte intraliposomale pH-Wert durch verschiedene Inkubationszeiten in Lösung mit definiertem äußerem pH-Wert variiert. Die Zeit-Abhängigkeit des Peakstroms korreliert mit der

Änderung des inneren pH-Wertes (*Seite 111, Abbildung 38*). Dies zeigt auch die Ähnlichkeit zwischen der Zeit-Abhängigkeit des Peakstroms und der Zeit-abhängigen Änderung der Fluoreszenz des intraliposomal lokalisierten pH-sensitiven Farbstoffs Pyranin nach pH-Titration (*Seite 92, Abbildung 30*). Kontrollen mit Monensin bestätigen, dass die pH-Abhängigkeit im sauren pH-Bereich um den  $pK_a$ -Wert nur durch den inneren pH-Wert, also durch die pH-Abhängigkeit der Protonenfreisetzungsreaktion resultiert. (*Seite 115, Abbildung 39*).

Ist die Konformationsänderung des leeren Carriers ratenlimitierend, beeinflusst die Protonenfreisetzungsreaktion die Umsatzrate. Die effektive Rate der Konformationsänderung des leeren Carriers wird durch das vorgelagerte Gleichgewicht der Protonenfreisetzung mit dem  $pK_a$ -Wert moduliert. Sinkt bei niedrigem pH-Wert  $< pK_a$  die Konzentration von  $P_{in}$ , wird die effektive Rate der Konformationsänderung von  $P_{in}$  zu  $P_{out}$  und damit auch die Umsatzrate im Symport-Modus reduziert. Experimente mit  $D_2O$  bestätigen diese Annahme (*Seite 100, Abbildung 32*). In  $D_2O$  ist zwar der  $pK_a$ -Wert der Protonenfreisetzung erhöht, aber die maximale Umsatzrate bleibt unbeeinflusst [*89, 160*]. Damit ist die Umsatzrate vom Gleichgewicht bzw. dem  $pK_a$ -Wert, nicht aber von der Ratenkonstanten der Protonenfreisetzungsreaktion abhängig, sodass die Protonenfreisetzung selbst nicht ratenlimitierend sein kann. Sie beeinflusst lediglich über das vorgelagerte Gleichgewicht die nachgeschaltete ratenlimitierende Reaktion.

### **Oberhalb des $pK_b$ -Wertes ist die Protonenbindung ratenlimitierend**

Das pH-Profil zeigt für jeden Transporter mindestens einen  $pK_b$ -Wert, sodass niedrige Protonenkonzentrationen die Umsatzrate im Symport-Modus reduzieren. Der  $pK_b$ -Wert konnte der Protonenbindung in der auswärtsgerichteten Konformation zugeordnet werden. Dafür gibt es zwei voneinander unabhängige Hinweise. Im MKM beeinflusst die Protonenbindung durch das vorgelagerte Gleichgewicht die Zuckerbindung. Tatsächlich erhöht sich der  $K_M$ -Wert des *steady-states* mit dem gefundenen  $pK_b$ -Wert in wt Xyle (*Seite 83, Abbildung 27*). Der  $pK_b$ -Wert in wt Xyle muss daher dem Protonierungsgleichgewicht vor der Zuckerbindung zugeordnet werden. Zudem zeigen SSM-Messungen an wt FucP mit pH-Gradienten, dass der Peakstrom im basischen pH-Bereich unabhängig vom intraliposomalen pH-Wert ist und nur vom äußeren pH-Wert beeinflusst wird (*Seite 116, Abbildung 40*).

Die Simulation im MKM zeigt jedoch eine Diskrepanz zwischen der simulierten und der gemessenen pH-Abhängigkeit der  $K_M$ -Werte (*Seite 139, Tabelle 26*). Die simulierten  $K_M$ -Werte im physiologischen pH-Bereich sind um bis zu eine Größenordnung niedriger als die gemessenen  $K_M$ -Werte. Gleichzeitig steigen die  $K_M$ -Werte mit dem pH-Wert in der Simulation wesentlich schneller an, als experimentell beobachtet. So resultieren für Xyle bei pH 7,6 und 10,6 in der Simulation  $K_M$ -Werte von 0,2 mM bzw.

33 mM und im Experiment von 1,7 mM bzw. 5,8 mM. Die Ursache für diese Diskrepanz liegt im MKM selbst (*Seite 61, Abbildung 18*). Hier ergibt sich die Reduktion der Umsatzrate mit dem  $pK_b$ -Wert ausschließlich aufgrund der Erhöhung des  $K_M$ -Wertes über die verwendeten Zuckerkonzentrationen hinaus. Daher ist in der Simulation der  $v_{max}$ -Wert oberhalb des pH-Optimums pH-unabhängig. Im MKM beeinflusst die Protonenbindung über das vorgelagerte Gleichgewicht den  $K_D$ -Wert. Hohe Zuckerkonzentrationen können damit niedrige Protonenkonzentrationen kompensieren, sodass sich im basischen pH-Bereich kein Einfluss auf die effektive Rate der nachfolgenden, ratenlimitierenden Konformationsänderung des beladenen Carriers und die Umsatzrate ergibt.

Die experimentellen Daten hingegen zeigen, dass der  $pK_b$ -Wert nicht nur Einfluss auf den  $K_M$ -Wert, sondern auch auf den  $v_{max}$ -Wert haben muss. Trotz Messungen unter sättigenden Bedingungen ergibt sich eine signifikante Abnahme des Transporterstroms, insbesondere bei Messungen an wt XylE zu erkennen (*Seite 102, Abbildung 34b*). Hier erfolgt die Messung des pH-Profiles mit  $c_s = 30$  mM. Bei pH 10,6 ist der Transporterstrom auf etwa 30 % des pH-Optimums gesunken, während sich der  $K_M$ -Wert von 1,7 mM (pH 7,6) auf 5,8 mM erhöht hat (*Seite 82, Tabelle 14*). Die Erhöhung des  $K_M$ -Wertes kann bei  $c_s = 30$  mM nicht für die Reduktion des Transporterstroms verantwortlich gemacht werden. Der pH-Wert muss damit auch einen großen Effekt auf die effektive Rate der Protonenbindung haben, sodass sie langsamer wird als die ratenlimitierende Reaktion im Transportzyklus. Bei extrem basischen pH-Werten gilt demnach die Annahme des schnellen Bindungsgleichgewichts für die Protonenbindung nicht mehr.

Eine alternative Möglichkeit zur Auflösung dieser Diskrepanz zwischen pH-Abhängigkeit der  $K_M$ -Werte und pH-Profil unter sättigenden Bedingungen wäre ein kinetisches Modell, in dem die Protonenbindung nach der Zuckerbindung erfolgt. Bei pH-Werten über dem  $pK_b$ -Wert würde dann nicht mehr der  $K_M$ -Wert erhöht, sondern die effektive Rate der Konformationsänderung des beladenen Carriers reduziert und so die Umsatzrate limitiert. Diese Möglichkeit ist im 8-Zustands-Modell ebenfalls berücksichtigt. Dass der Zucker im Falle von LacY überwiegend vor dem Proton bindet, gilt jedoch als eher unwahrscheinlich, da der Zucker die Zugänglichkeit zur Protonenbindestelle in LacY blockiert [135].

### **Das Zuckersubstrat beeinflusst die Ratenkonstante des beladenen Carriers**

Da die Umsatzrate in LacY mit etwa  $30 \text{ s}^{-1}$  [73] signifikant niedriger ist als die Ratenkonstante der Konformationsänderung des beladenen Carriers ( $250 \text{ s}^{-1}$  [163]), kann die Konformationsänderung des beladenen Carriers unter physiologischen Bedingungen für LacY nicht ratenlimitierend sein. Das pH-Profil mit  $pK_a = 7,5$  für den D-Lactose-Transport in LacY zeigt, dass bei pH 7,6 die Konformationsänderung des leeren Carriers ratenlimitierend ist (*Seite 102, Abbildung 34a*). Da

verschiedene Zucker in LacY und FucP bei pH 7,6 einen Einfluss auf die Umsatzrate haben ([Seite 85, Tabelle 15](#)), muss in diesen Fällen allerdings eine Reaktion im Zucker-Translokationsweg ratenlimitierend werden. Für FucP und XylE liegt das breite pH-Optimum tatsächlich bei pH 7,6 ([Seite 102, Abbildung 34](#)), sodass eine pH-unabhängige Reaktion ratenlimitierend ist. Protonenbindung, Protonenfreisetzung und die Konformationsänderung des leeren Carriers können als ratenlimitierende Reaktionen für die sekundären Substrate damit ausgeschlossen werden.

### **Die Teilreaktionen im beladenen Carrier**

Im MKM wird die Zuckerbindung als schnelles Gleichgewicht betrachtet ([Seite 61, Abbildung 18](#)) und kann daher ebenso als ratenlimitierende Reaktion im Zucker-Translokationsweg ausgeschlossen werden. Bei hohen Substratkonzentrationen sind Bindungsreaktionen im Allgemeinen wesentlich schneller als globale Konformationsänderungen in Membrantransportern. So haben Bindungsreaktionen oft mit  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bis  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  diffusionskontrollierte Ratenkonstanten [\[283\]](#). Für LacY liegt die Ratenkonstante der Zuckerbindung in dieser Größenordnung [\[168\]](#). Dass die ermittelten effektiven Raten des *induced fits* in LacY und XylE von der Zeitauflösung limitiert sind ( $> 300 \text{ s}^{-1}$ ; [Seite 107, Tabelle 20](#)), bestätigt die hohe Geschwindigkeit der Zuckerbindung. Da die Abklingzeiten des *pre steady-state* Signals für alle Substrate identisch sind ([Seite 88, Abbildung 29](#)), kann der *induced fit* ebenfalls als ratenlimitierende Reaktion ausgeschlossen werden.

Im MKM sind weiterhin nur Zuckerfreisetzung und die Konformationsänderung des beladenen Carriers Zucker-abhängige Reaktionen. In der Literatur wird die Zuckerfreisetzung als ratenlimitierende Reaktion für LacY im Potential-getriebenen *Uptake* beschrieben [\[124\]](#), also unter Bedingungen, bei denen die Konformationsänderung des leeren Carriers nicht ratenlimitierend ist. Dies wird ohne experimentelle Evidenzen postuliert. Selbst für das hochaffine LacY-Substrat NPG (KD =  $40 \mu\text{M}$ ) wurde eine Ratenkonstante für die Zuckerfreisetzung ( $k_{\text{off}}$ ) von  $160 \text{ s}^{-1}$  gefunden [\[168\]](#). Da LacY mit NPG [\[284, 285\]](#) eine geringere Transportrate zeigt als mit D-Lactose (ca.  $30 \text{ s}^{-1}$  [\[73\]](#)), kann die Zuckerfreisetzung mit  $160 \text{ s}^{-1}$  nicht die Umsatzrate limitieren. Im MKM wird die Zuckerfreisetzung daher aus Symmetriegründen wie die Zuckerbindung als schnelles Gleichgewicht betrachtet. Damit bleibt lediglich die Konformationsänderung des beladenen Carriers als mögliche ratenlimitierende Reaktion im Zuckertranslokationsweg übrig.

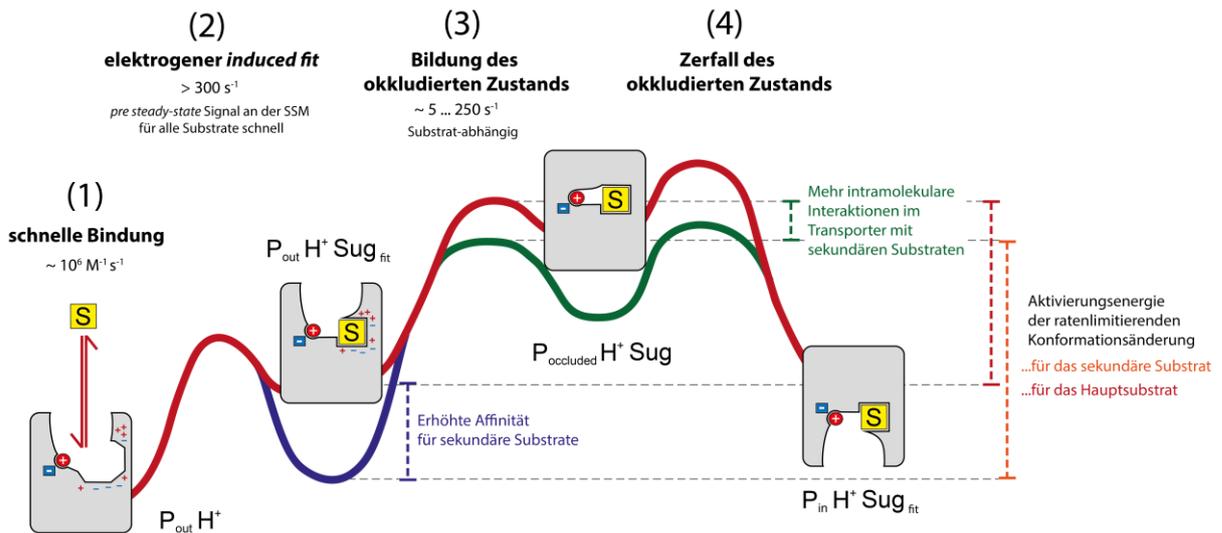
Für den Transport von D-Lactose in LacY wird die Ratenkonstante der Konformationsänderung des beladenen Carriers auf Basis einer Simulation elektrophysiologische Daten mit etwa  $250 \text{ s}^{-1}$  angenommen [\[163\]](#). Sie ist damit signifikant langsamer als die Bindungsreaktion bei hohen Zuckerkonzentrationen ( $10^5 \text{ s}^{-1}$  bei  $0,1 \text{ M}$ ). Für sekundäre Substrate könnte diese Ratenkonstante unter die Umsatzrate für D-Lactose von  $30 \text{ s}^{-1}$  fallen, sodass sie ratenlimitierend wird.

### **Die Substrattranslokationsrate sinkt mit steigender Affinität**

*Abbildung 56* zeigt ein allgemeines Energiediagramm für die Zuckerbindung an den protonierten Carrier und die nachfolgende Konformationsänderung des beladenen Carriers. Es basiert auf dem für PMF-gekoppelten Zuckertransport formulierte Energiediagramm nach Madej et al. [144]. Die Bindungsreaktion selbst wird unter den gegebenen experimentellen Bedingungen (100 mM Zuckersubstrat) als schnell angenommen (*Reaktion 1*). Der schnellen Bindung nachgeschaltet ist der langsamere, aber unter keinen Umständen ratenlimitierende *induced fit* ( $> 300 \text{ s}^{-1}$ ) des Zuckermoleküls (*Reaktion 2*). Im 8-Zustands-Modell (*Seite 150, Abbildung 54*) folgt nun die Konformationsänderung des beladenen Carriers von der auswärtsgerichteten in die einwärtsgerichtete Konformation, welche im Energiediagramm durch die Bildung (*Reaktion 3*) und den Zerfall (*Reaktion 4*) des okkludierten Zustands repräsentiert ist. Nach Madej et al. ist die Bildung des okkludierten Zustands ratenlimitierend für den Zuckertranslokationsweg [144, 146].

Das Energiediagramm zeigt, dass eine Erhöhung der Zuckeraffinität (*blaue Kurve*) automatisch mit einer niedrigeren Transportrate einhergehen muss, wenn die Bildung des okkludierten Zustands ratenlimitierend ist. Eine erhöhte Affinität bedeutet eine Verringerung des Energieniveaus für den Substrat-gebundenen Zustand ( $P_{\text{outHS}}$ ). Bleibt das Energieniveau des Übergangszustandes der nachfolgenden Reaktion unbeeinflusst, ergibt sich automatisch eine größere Aktivierungsenergie für die nachfolgende Konformationsänderung (*Reaktion 3*). Wenn diese ratenlimitierend ist, bestimmt sie gleichzeitig den  $v_{\text{max}}$ -Wert im *steady-state*.

Eine solche Korrelation zwischen Affinitäten und Umsatzraten wird experimentell tatsächlich beobachtet. Zugrunde liegt die Annahme, dass der  $K_M$ -Wert qualitativ dieselbe Substrat-Abhängigkeit aufweist wie der  $K_D$ -Wert, was zumindest für LacY experimentell bestätigt wurde (*Seite 85, Tabelle 15; Seite 87, Tabelle 16*). So hat in LacY das Hauptsubstrat D-Lactose den höchsten  $K_M$ -Wert (niedrigste Affinität) und gleichzeitig den höchsten  $v_{\text{max}}$ -Wert, verglichen mit den sekundären Substraten Lactulose und TDG (*Seite 85, Tabelle 15*). In FucP hat das Hauptsubstrat L-Fucose einen um eine Größenordnung niedrigeren  $K_M$ -Wert (höchste Affinität) und zugleich einen um etwa 30 % niedrigeren  $v_{\text{max}}$ -Wert, verglichen mit L-Galactose und D-Arabinose (*Seite 85, Tabelle 15*). Diese Korrelation deutet darauf hin, dass die Konformationsänderung des beladenen Carriers abhängig vom Substrat ratenlimitierend werden kann.



**Abbildung 56: Energiediagramm für die Zuckerbindung und nachfolgende Konformationsänderung des beladenen Carriers.** Dem Energiediagramm liegt das Bindungsmodell in [Abbildung 24 \(Seite 76\)](#) zugrunde, das den schnellen, elektrogenen *induced fit* und die anschließende Bildung des okkludierten Zustands separiert. Ein alternatives Modell ist in [Abbildung 58 \(Seite 175\)](#) dargestellt. Die rote Kurve repräsentiert ein hypothetisches Energiediagramm für den entsprechenden Teilzyklus des Transports eines Substrats, z.B. für den Transport von Lactulose durch LacY. Blaue und grüne Kurven zeigen mögliche Einflüsse anderer Substrate auf das Energiediagramm. Zunächst erfolgt die schnelle Bindung des Zuckersubstrats (1), gefolgt von dem langsameren elektrogenen *induced fit* (2), dessen Rate für alle getesteten Substrate auf Basis des *pre steady-state* Signals zu  $> 300 \text{ s}^{-1}$  bestimmt wurde ([Seite 88, Abbildung 29](#)). Substrate, die eine erhöhte Affinität aufweisen (blaue Kurve), ergeben zwangsläufig eine höhere Aktivierungsenergie der nachfolgenden Bildung des okkludierten Zustands (3). Ist diese ratenlimitierend für den Transport, so beeinflusst die Affinität auch die Umsatzrate. Die gefundene Korrelation zwischen  $K_D$ - bzw.  $K_M$ -Werten und Umsatzraten ([Seite 85, Tabelle 15](#) bzw. [Seite 87, Tabelle 16](#)) weist demnach darauf hin, dass die Konformationsänderung des beladenen Carriers für sekundäre Substrate ratenlimitierend sein könnte. Tatsächlich sollten sich bei diesem Zusammenhang die Transportrate und die Affinität um denselben Faktor ändern ([Abbildung 57](#)), was nicht der Fall ist ([Seite 85, Tabelle 15](#)). Verschiedene Substrate induzieren jedoch unterschiedliche Transporter-Konformationen, wie die unterschiedlichen Ladungsverschiebungen der *pre steady-state* Reaktionen ([Seite 87, Tabelle 16](#)) und die verschiedenen Interaktionsnetzwerke Substrat-okkludierter Konformationen ([Seite A10, Abbildung 65](#)) zeigen. Mit gebundenem TDG ist die Anzahl der Interaktionen im okkludierten Zustand in LacY erhöht. Dies könnte mit einer Absenkung der freien Enthalpie des Transporters interpretiert werden (grüne Kurve) und liefert eine mögliche Erklärung dafür, dass die Umsatzrate (also die Aktivierungsenergie  $\Delta G^*$ ) verschiedener Substrate in LacY nicht so stark sinkt (Faktor 3 zwischen TDG und Lactulose), wie die Erhöhung der Affinität (Faktor 20) in diesem Modell fordern würde.

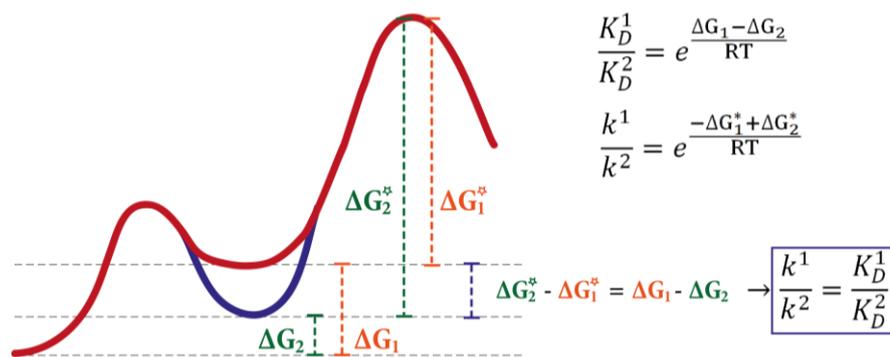
### Jedes Substrat induziert eine andere Transporter-Konformation

Eine quantitative Betrachtung verdeutlicht jedoch, dass die Affinität alleine nicht die veränderte Umsatzrate erklärt. Nach Arrhenius fällt die Ratenkonstante exponentiell mit der Aktivierungsenergie  $\Delta G^*$  ([Gleichung G63](#)). Gleichzeitig steigt die Bindungsaffinität exponentiell mit der Differenz der freien Energien der Edukte und Produkte  $\Delta G^0$  ([Gleichung G64](#)).

$$k = A \cdot e^{-\frac{\Delta G^*}{RT}} \quad \text{G63}$$

$$K_D = e^{\frac{\Delta G^0}{RT}} \quad \text{G64}$$

So müsste sich bei einer Änderung der Affinität die Ratenkonstanten der Konformationsänderung des beladenen Carriers um denselben Faktor ändern ([Abbildung 57](#)).



**Abbildung 57: Einfluss der Änderung des KD-Wertes auf die Aktivierungsenergie der nachfolgenden Reaktion.** Hat das Substrat 2 im Vergleich zum Substrat 1 eine erhöhte Affinität (blaue Kurve), so sinkt die freie Enthalpie des Substrat-gebundenen Zustands von  $\Delta G_1$  auf  $\Delta G_2$ . Gleichzeitig steigt die Aktivierungsenergie der nachfolgenden Reaktion von  $\Delta G_1^*$  auf  $\Delta G_2^*$ . Die entsprechend angegebenen Differenzen sind identisch. Aus den Gleichungen G63 und G64 folgt damit, dass die Verhältnisse aus Ratenkonstanten  $k_1/k_2$  und KD-Werten  $K_{D1}/K_{D2}$  der beiden Substrate identisch sein müssen.

Ein solcher Zusammenhang konnte nicht gefunden werden. Tatsächlich ist die Auswirkung auf die Umsatzrate nicht so hoch, wie die Änderung des KM-Wertes in diesem Modell erfordert. In LacY zeigt der Vergleich zwischen KM- und  $v_{max}$ -Werten von TDG und Lactulose, dass der KM-Wert in TDG um einen Faktor 20, der  $v_{max}$ -Wert aber nur um einen Faktor 3 reduziert ist (Seite 85, Tabelle 15). Der  $v_{max}$ -Wert ist damit für TDG weniger reduziert, als die KD-Erniedrigung fordern würde. Um dies auszugleichen, müsste die Energie des Übergangszustandes (Abbildung 56, Reaktion 3) für TDG im Vergleich zur Energie des Übergangszustandes für Lactulose reduziert sein (Abbildung 56, grüne Kurve). Tatsächlich wird dies auch durch den Einfluss von TDG auf das Interaktionsnetzwerk des Transporters gestützt. Der Transporter mit gebundenem TDG weist mehr intramolekulare Interaktionen auf als die Substrat-freie Struktur. TDG induziert damit eine rigidere Konformation (Seite A10, Abbildung 65a). Dies könnte einerseits als Absenkung der Enthalpie (reduziertes  $\Delta G$ ), andererseits aber auch als Absenkung der Entropie (erhöhtes  $\Delta G$ ) in der Transporter-Konformation mit gebundenem TDG interpretiert werden. Der Einfluss auf die freie Enthalpie  $\Delta G$  ist damit zunächst unklar. Da sekundäre Substrate in LacY und Xyle jedoch einen im Vergleich zum Hauptsubstrat reduzierten KD-Wert aufweisen, deutet dies darauf hin, dass der enthalpische Beitrag überwiegt und  $\Delta G$  tatsächlich reduziert wird. Mehr Interaktionen in der TDG-gebundenen Struktur reduziert die freie Enthalpie im gesamten Reaktionspfad des Substrat-gebundenen Carriers. Der KD-Wert ist für TDG reduziert, was die geringere Umsatzrate mit TDG erklärt. Der  $v_{max}$ -Wert nimmt jedoch nicht so stark ab wie erwartet, da auch der folgende Übergangszustand in seiner freien Enthalpie abgesenkt ist (Abbildung 56, grüne Kurve). Ähnlich verhält es sich in Xyle. D-Glucose induziert im Gegensatz zu D-Xylose ein Interaktionsnetzwerk mit wesentlich mehr Interaktionen. Die intramolekularen Interaktionen im Substrat-freien Zustand sind dagegen nahezu identisch mit denen im D-Xylose-gebundenen Transporter (Seite A10, Abbildung 65b).

Es ist anzumerken, dass sich sekundäre Substrate in FucP genau entgegengesetzt verhalten. In FucP sind die  $K_M$ -Werte für die sekundären Substrate im Vergleich zum  $K_M$ -Wert von L-Fucose um einen Faktor 10 erhöht. Der  $v_{max}$ -Wert ist dagegen nur um etwa 30 % erhöht. Der  $v_{max}$ -Wert der sekundären Substrate ist damit weniger erhöht als die  $K_M$ -Erhöhung gemäß [Abbildung 57](#) fordern würde. In einem quantitativen Modell müsste das Energieniveau des Übergangszustandes für die sekundären Substrate signifikant höher liegen als für das Hauptsubstrat, während in LacY das Energieniveau des Übergangszustandes in TDG gegenüber dem in Lactulose reduziert sein muss (siehe [oben](#)). Damit sagt dieses Modell für die sekundären Substrate in FucP ein Interaktionsnetzwerk mit weniger Interaktionen, also eine dynamischere okkludierte Konformation voraus. Für FucP gibt es keine Substrat-gebundenen, okkludierten Strukturen, um dies zu überprüfen.

Das beschriebene Modell ist auch mit der Interpretation der *pre steady-state* Ladungsverschiebung als *induced fit* kompatibel. Verschiedene Substrate zeigen unterschiedliche Ladungsverschiebungen im *induced fit* ([Seite 87, Tabelle 16](#)), was auf einen anderen Transporter-Zustand nach der elektrogenen Zuckerbindung hinweist. Neben dem Einfluss der Substrate auf das Interaktionsnetzwerk ([Seite A10, Abbildung 65](#)) ist dies ein weiterer Hinweis dafür, dass verschiedene Substrate unterschiedliche Transporter-Zustände induzieren, deren Energieniveaus sich unterscheiden können. Die Energieniveaus der Transporter nach der Substratbindung unterscheiden sich daher abhängig vom Substrat, was im Energiediagramm durch Substrat-abhängige Reaktionspfade berücksichtigt werden kann ([Abbildung 56](#)). Zusammengefasst kann die Transportaktivität in diesem Modell auf mehrere Weisen beeinflusst werden:

- (1) Eine Reduktion des Energieniveaus in der auswärtsgerichteten, Zucker-gebundenen Konformation bzw. eine erhöhte Affinität erhöht die Energiebarriere für die Bildung des okkludierten Zustands ([Abbildung 56, blaue Kurve](#)).
- (2) Eine Veränderung der Energie des Übergangszustandes für die Bildung des okkludierten Zustandes beeinflusst direkt die entsprechende Energiebarriere ([Abbildung 56, Reaktion 3](#)).
- (3) Sinkt das Energieniveau des okkludierten Zustandes erheblich, könnte auch der Zerfall des okkludierten Zustandes ratenlimitierend werden ([Abbildung 56, Reaktion 4](#)). Dies könnte auch erklären, weshalb D-Glucose in wt XylE nicht transportiert wird.

Auf der Ebene des Energiediagramms funktionieren Transporter sehr wahrscheinlich analog zu Enzymen. Für Enzyme werden als ideale Parameter zwar eine hohe Affinität und eine gleichzeitig niedrige Aktivierungsenergie für die enzymatische Reaktion, also ein großer Spezifitätskoeffizient  $k_{cat}/K_M$  genannt [[238](#)]. Abhängig vom Protein können zu hohe Affinitäten jedoch sowohl für Enzyme als auch für Transporter dazu führen, dass die erhöhte Aktivierungsenergie für die nachfolgende Reaktion die Umsatzrate signifikant reduziert. Das Energieniveau des Übergangszustandes

beeinflusst ebenfalls die Aktivierungsenergie für die Transport- bzw. enzymatische Reaktion. Bei Enzymen induziert das Protein den Übergangszustand des Substrats und reduziert die Energiebarriere für die Produktbildung. Im Transporter induziert dagegen das Substrat den Übergangszustand des Transporters und reduziert so die Energiebarriere für die Konformationsänderung. Je nach Substrat sind Affinität und Übergangszustand verändert und damit auch die Umsatzrate beeinflusst. Substrate mit einer hohen Affinität oder einem hohen Energieniveau für den Übergangszustand wirken automatisch als Inhibitor, da das Protein in einem Energieminimum festgehalten wird [286].

### ***Der Transport von D-Lactose in LacY bei pH 7,5***

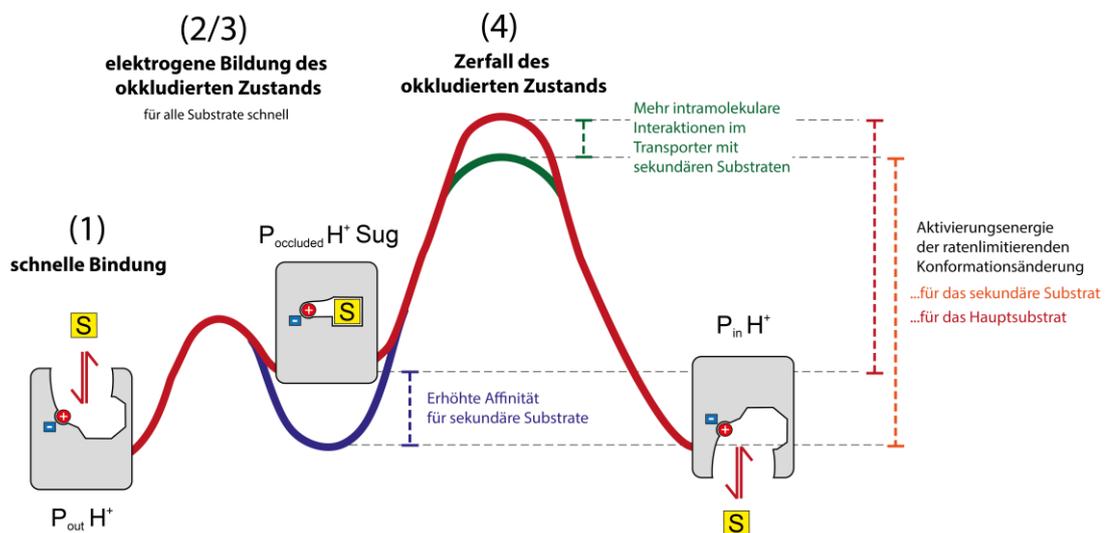
Das beschriebene Modell impliziert, dass für den Zucker-getriebenen Symport unter physiologischen pH-Bedingungen für die meisten Substrate die Konformationsänderung des beladenen Carriers nach der Zuckerbindung ratenlimitierend ist. Damit ist der Transport von D-Lactose durch LacY im physiologischen pH-Bereich ein Sonderfall: Hier ist die Konformationsänderung des leeren Carriers ratenlimitierend [89, 160], wie auch die pH-Abhängigkeit zeigt. Die Umsatzrate für den D-Lactose-Transport in LacY liegt bei pH 7,6 im Gegensatz zu den Umsatzraten von FucP und XylE für den Transport ihrer Hauptsubstrate nicht im Bereich des pH-Optimums (Seite 102, Abbildung 34). Nur für den Transport von D-Lactose in LacY ist eine pH-abhängige Reaktion ratenlimitierend.

Es ist anzumerken, dass die Ratenlimitierung der Umsatzrate für den Transport von D-Lactose durch die Konformationsänderung des leeren Carriers erklärt, weshalb die Faktoren der  $K_D$ - und  $v_{max}$ -Wert-Änderungen bei Vergleich zwischen D-Lactose und TDG nicht identisch sein müssen, wie das Modell in Abbildung 57 fordert. Der  $v_{max}$ -Wert wird für D-Lactose von der effektiven Rate der Konformationsänderung im leeren Carrier bestimmt, während für TDG der  $v_{max}$ -Wert von der Ratenkonstante der Konformationsänderung im beladenen Carrier limitiert wird. Tatsächlich ist mit den beschriebenen Annahmen die Ratenkonstante der Konformationsänderung im beladenen Carrier für den Transport von D-Lactose ( $250 \text{ s}^{-1}$ ) um einen Faktor 50 größer als für TDG (20 % Umsatzrate im Vergleich zu D-Lactose mit  $30 \text{ s}^{-1}$ ; Seite 85, Tabelle 15). Der Faktor 50 wird auch bei einem Vergleich der  $K_D$ -Werte zwischen TDG und D-Lactose erhalten. Aus diesem Grund wurden die obigen Vergleiche für LacY zwischen Lactulose und TDG durchgeführt, da hier in beiden Fällen die Konformationsänderung im beladenen Carrier ratenlimitierend sein muss (Seite 85, Tabelle 15).

### ***Die Bildung des okkludierten Zustands ist nicht elektrogen***

Zuletzt soll geklärt werden, weshalb in der vorliegenden Arbeit der elektrogene *induced fit* und die Bildung des okkludierten Zustands im Widerspruch zu Garcia-Celma et al. [163] als separate Reaktionen interpretiert werden. Eine alternative Möglichkeit zum Bindungsmodell in Abbildung 24 (Seite 76) und dem damit verbundenen Energiediagramm in Abbildung 56 wäre die Bildung des

okkludierten Zustands wie in Garcia-Celma et al. als die elektrogene *pre steady-state* Reaktion zu interpretieren (*Abbildung 58*). In diesem Fall müsste der Zerfall des okkludierten Zustands ratenlimitierend sein, da die elektrogene Reaktion für alle Substrate sehr schnell erfolgt (*Seite 88, Abbildung 29*). Eine direkte Konsequenz für das Energiediagramm wäre das sehr niedrige Energieniveau des okkludierten Zustandes in Verbindung mit einer hohen Aktivierungsenergie für den Zerfall des okkludierten Zustandes. Ein solches Energiediagramm ist in *Abbildung 58* dargestellt. Der okkludierte Zustand wäre kein hochenergetischer, metastabiler Zustand mehr. Darüber hinaus resultieren asymmetrische Bindungseigenschaften. Beides widerspricht dem Energiediagramm nach Madej et al. und den zugrunde liegenden experimentellen Daten für LacY [144, 146]. Aus diesem Grund wird dieses minimale Bindungsmodell verworfen und der elektrogene *induced fit* als zusätzliche Reaktion eingeführt.



**Abbildung 58:** Energiediagramm für die Zuckerbindung und nachfolgende Konformationsänderung des beladenen Carriers in einem Modell nach Garcia-Celma et al. Im Gegensatz zum Energiediagramm in *Abbildung 56* wird hier der elektrogene *induced fit* und die Bildung des okkludierten Zustands wie in Garcia-Celma et al. [163] als dieselbe Reaktion betrachtet (2/3). Es handelt sich um ein vereinfachtes Bindungsmodell, das jedoch Konsequenzen hat, die verschiedenen experimentellen Daten in der Literatur, insbesondere dem Energiediagramm nach Madej et al. [144, 146] widersprechen. Da die elektrogene *pre steady-state* Reaktion für alle Substrate sehr schnell ist (*Seite 88, Abbildung 29*), kann die Bildung des okkludierten Zustands in diesem Modell nicht die ratenlimitierende Reaktion im Zucker-Translokationsweg sein. Stattdessen muss der Zerfall des okkludierten Zustands (4) gemäß der beschriebenen Relation zwischen  $K_D$ - und  $v_{max}$ -Werten (*Abbildung 57*) als ratenlimitierend betrachtet werden. Der okkludierte Zustand wäre dann kein hochenergetischer, metastabiler Zustand mehr. Zudem sind in diesem Modell die Bindungseigenschaften des Transporters asymmetrisch. Um diese Widersprüche mit Madej et al. [144, 146] zu umgehen, wird der elektrogene *induced fit* als zusätzliche Reaktion eingeführt und das Bindungsmodell in *Abbildung 24 (Seite 76)* dem Energiediagramm in *Abbildung 56* zugrunde gelegt. Eine detailliertere Beschreibung ist in *Abbildung 56* zu finden.

## Membranpotential und Substrate beeinflussen das pH-Profil

Die pH-Werte innen und außen beeinflussen die ratenlimitierende Reaktion (siehe *oben*): Unterhalb des  $pK_a$ -Wertes ist die Konformationsänderung des leeren Carriers ratenlimitierend. Oberhalb des  $pK_b$ -Wertes wird die Protonenbindung selbst ratenlimitierend. Dies resultiert aus einem Einfluss der Protonenkonzentration auf die effektiven Raten der entsprechenden Reaktionen.

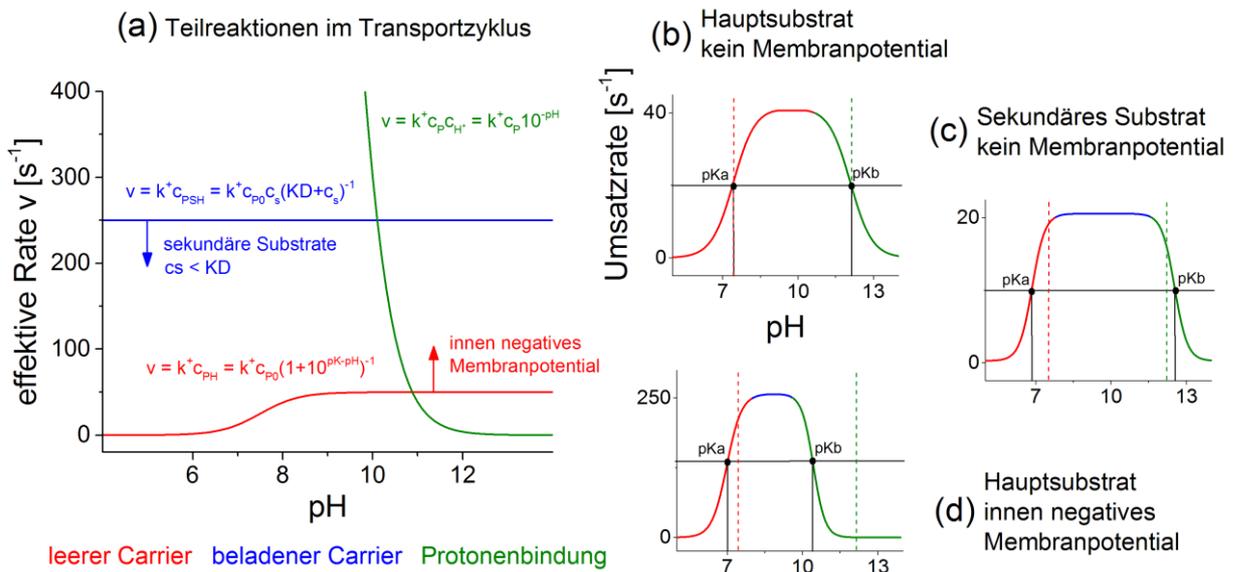
Das Zuckersubstrat bestimmt hingegen direkt die Ratenkonstante der Konformationsänderung des beladenen Carriers (*Seite 171, Abbildung 56*), während ein anliegendes Membranpotential die Ratenkonstante der Konformationsänderung des leeren Carriers beeinflusst, da letztere im *steady-state* elektrogen ist (*Seite 165, Abbildung 55*). Damit bestimmen Substrat und Membranpotential bei gegebenem pH-Wert und unter Annahme sättigender Zuckerkonzentrationen welche der beiden Konformationsänderungen ratenlimitierend ist. In *Tabelle 29* ist der Einfluss verschiedener äußerer Bedingungen auf die effektiven Raten verschiedener Reaktionen im Transportzyklus zusammengefasst.

**Tabelle 29: Einfluss verschiedener äußerer Bedingungen auf die effektiven Raten ratenlimitierender Reaktionen im Symport-Modus.** Das Membranpotential beeinflusst ausschließlich die Ratenkonstante für die Konformationsänderung des leeren Carriers (*Seite 165, Abbildung 55*). Die Substrat-Spezies beeinflusst dagegen die Ratenkonstante für die Konformationsänderung des beladenen Carriers (*Seite 171, Abbildung 56*). So können abhängig von Substrat und Membranpotential bei gegebenem pH-Wert beide Konformationsänderungen ratenlimitierend werden. Die Konsequenz ist eine Verschiebung der pH-Profile bzw. eine Abhängigkeit der apparenten pK-Werte von Substrat-Spezies und Membranpotential (*Abbildung 59*).

Äußere Bedingung	Effekt auf die Ratenlimitierung
pH < pKa	Vorgelagertes Gleichgewicht der Protonenfreisetzung verlangsamt leeren Carrier
pH-Optimum	Leerer Carrier oder beladener Carrier, abhängig vom Substrat und Potential
pH > pKb	Protonenbindung ist verlangsamt, KD-Wert ist erhöht.
$\Delta\phi < 0$	Leerer Carrier wird beschleunigt
$\Delta\phi > 0$	Leerer Carrier wird verlangsamt
cs < KD	Vorgelagertes Gleichgewicht der Zuckerbindung verlangsamt beladenen Carrier
Substrat-Spezies	Beladener Carrier wird verlangsamt oder beschleunigt

Membranpotential und Substrat haben aufgrund des Einflusses auf die Ratenkonstanten der Konformationsänderungen des leeren bzw. beladenen Carriers auch Auswirkungen auf das pH-Profil und bewirken eine Veränderung der apparenten pK-Werte. *Abbildung 59a* zeigt hypothetische pH-Profile für ratenlimitierende Teilreaktionen im Transportzyklus von LacY auf Basis der für LacY experimentell bestimmten Ratenkonstanten für die Konformationsänderung des leeren und des beladenen Carriers. Es soll der Transport von D-Lactose im einwärtsgerichteten Symport-Modus betrachtet werden. Wird ausgehend von saurem pH-Wert der pH-Wert stetig erhöht, so erreicht die effektive Rate der Konformationsänderung des leeren Carriers oberhalb des pKa-Wertes am Maximum des pH-Profils ihre maximale effektive Rate von ca.  $50 \text{ s}^{-1}$  (*Abbildung 59a, rote Kurve*). An diesem Punkt ist die effektive Rate der Konformationsänderung des beladenen Carriers mit etwa  $250 \text{ s}^{-1}$  noch signifikant größer als die des leeren Carriers. Wenn der pH-Wert weiter über den pKb-Wert hinaus erhöht wird, sinkt die effektive Rate der Protonenbindung unter die effektive Rate

der Konformationsänderung des leeren Carriers und bestimmt damit die Umsatzrate. Die effektive Rate der Konformationsänderung des beladenen Carriers ist in diesem Fall immer schneller als die ratenlimitierende Reaktion. Aus der pH-Abhängigkeit der effektiven Raten der Teilreaktionen lässt sich ein hypothetisches pH-Profil für die Umsatzrate ableiten (*Abbildung 59b*). Es beschreibt die pH-Abhängigkeit des D-Lactose Transports in LacY.



**Abbildung 59: pH-Abhängigkeit der Umsatzrate und der effektiven Raten ratenlimitierender Reaktionen im Transportzyklus.** (a) pH-Abhängigkeit der effektiven Raten der Konformationsänderungen des leeren (rot) und beladenen (blau) Carriers und der Protonenbindung (grün). Die effektive Rate der Konformationsänderung des leeren Carriers wird von dem vorgelagerten Deprotonierungsgleichgewicht beeinflusst (rot), sodass der pKi-Wert der halbmaximalen effektiven Rate entspricht. Die Protonenbindung wird bei basischen pH-Werten selbst ratenlimitierend (grün), wobei die effektive Rate der Protonenbindung linear mit abnehmender Protonenkonzentration sinkt. Zudem beeinflusst die Substrat-Spezies die Ratenkonstante der Konformationsänderung im beladenen Carrier (blau), während das Membranpotential die Ratenkonstante der elektrogenen Konformationsänderung im leeren Carrier bestimmt. (b) Aus der pH-Abhängigkeit der effektiven Raten in (a) kann ein hypothetisches pH-Profil der Umsatzrate abgeleitet werden. Das dargestellte pH-Profil beschreibt den Transport von D-Lactose, wie er im SSM-Experiment beobachtet wird (*Seite 102, Abbildung 34*). Das pH-Profil zeigt, dass die Ratenkonstante der Konformationsänderung des leeren Carriers die Umsatzrate am pH-Optimum bestimmt. Der pKi-Wert entspricht dem apparenten pKa-Wert, wie Simulationen im MKM bereits gezeigt haben (*Seite 139, Tabelle 26*) (c) Hypothetisches pH-Profil für ein sekundäres Substrat. Hier bestimmt die reduzierte Ratenkonstante für die Konformationsänderung des beladenen Carriers die Umsatzrate am pH-Optimum, gemäß *Abbildung 56 (Seite 171)*. (d) Hypothetisches pH-Profil eines Hauptsubstrats bei anliegendem Membranpotential. Am pH-Optimum bestimmt die Ratenkonstante der Konformationsänderung des beladenen Carriers die Umsatzrate, weil die Konformationsänderung des leeren Carriers beschleunigt ist. In allen drei pH-Profilen (b-d) ist zu erkennen, dass die apparenten pK-Werte durch Potential und Substrat beeinflusst werden.

Dieses Modell berücksichtigt die Umsatzratenverhältnisse für verschiedene Transportmodi in LacY. Bei sättigenden Zuckerkonzentrationen (10 mM) und pH 7,5 erfolgt in Proteoliposomen der Zucker-Austausch um einen Faktor 10 schneller als der Symport [80]. Gleichzeitig ist am pH-Optimum der Symport um einen Faktor 5 größer als bei pH 7,5 [89], sodass am pH-Optimum der Austausch schneller erfolgt als der Symport. Für den Symport ist die Konformationsänderung des leeren Carriers ratenlimitierend, während für den Austausch die schnellere Konformationsänderung des beladenen Carriers die Umsatzrate bestimmt.

Sekundäre Substrate können die Ratenkonstante der Konformationsänderung des beladenen Carriers reduzieren, indem sie die Aktivierungsenergie für die Konformationsänderung erhöhen (*Seite 171, Abbildung 56*). Auch niedrige Zuckerkonzentrationen ( $c_s < K_D$ ) können über das vorgelagerte Gleichgewicht die effektive Rate des beladenen Carriers reduzieren. Auch wenn gleichzeitig die effektive Rate der Zuckerbindung für  $c_s \ll K_D$  so niedrig werden könnte, dass die Annahme eines schnellen Bindungsgleichgewichts nicht mehr gilt, bleibt die Konformationsänderung des beladenen Carriers aufgrund des vorgelagerten Gleichgewichts immer langsamer als die Zuckerbindung. Wenn durch diese Effekte die effektive Rate des beladenen Carriers unter die effektive Rate des leeren Carriers fällt, wird der beladene Carrier am pH-Optimum ratenlimitierend. Damit verbunden sind eine niedrigere Umsatzrate am pH-Optimum und gleichzeitig eine Verbreiterung des pH-Optimums. Dadurch bedingt kommt es zur Erhöhung des apparenten  $pK_b$ -Wertes, während der apparente  $pK_a$ -Wert kleiner wird (*Abbildung 59c*). Diese Änderungen im pH-Profil für den Transport verschiedener Substrate wurden bisher nicht experimentell überprüft, werden aber durch das vorgeschlagene Modell der Ratenlimitierungen vorhergesagt.

Ein innen negatives Membranpotential beschleunigt die Vorwärtsratenkonstante des leeren Carriers, sodass zunächst nur die maximale Umsatzrate steigt und der apparente  $pK_b$ -Wert sinkt. Wird die effektive Rate des leeren Carriers über die des beladenen Carriers beschleunigt, so wird der beladene Carrier ratenlimitierend und auch der apparente  $pK_a$ -Wert sinkt (*Abbildung 59d*). Ein innen positives Membranpotential hat genau den entgegengesetzten Effekt. Der Einfluss eines Membranpotentials auf die  $pK$ -Werte ist für LacY bereits experimentell bestätigt. Im Potential-getriebenen *Uptake*-Experiment wurden  $pK_a$ - und  $pK_b$ -Werte von 6,3 bzw. 9,0 ermittelt [282]. Im Zucker-getriebenen Symport liegen die entsprechenden  $pK$ -Werte bei  $pK_a = 8,0$  (8,5 im Efflux [89] bzw. 7,5 im Influx, *Seite 103, Tabelle 19*) und  $pK_b = 10,9$  (*Seite 103, Tabelle 19*). Unter Einfluss des Membranpotentials verschiebt sich das pH-Profil, sodass das pH-Optimum nicht nur für XylE und FucP, sondern auch für LacY im Bereich des physiologischen pH-Wertes (7,6) liegt.

Das Modell erklärt auch die Beobachtung, dass bei einem innen negativen Membranpotential nicht mehr die Konformationsänderung des leeren Carriers, sondern die des beladenen Carriers ratenlimitierend ist (*Abbildung 59d*). Im *Uptake*-Assay (innen negatives Membranpotential) ist die Umsatzrate  $v_{max}$  gegenüber der im Efflux-Assay (kein Membranpotential) um einen Faktor 3 erhöht [73, 123]. Dass unter Einfluss des Membranpotentials eine andere Reaktion ratenlimitierend wird, wurde durch Messungen in  $D_2O$  gefunden: Im Efflux-Experiment wird aufgrund des KIE die Umsatzrate in  $D_2O$  reduziert [89, 160]. Interessanterweise wird im *Uptake*-Experiment die Umsatzrate in  $D_2O$  nicht reduziert, sodass eine andere Potential-unabhängige Reaktion ratenlimitierend werden muss. Das Membranpotential beschleunigt also die Konformationsänderung

des leeren Carriers [162] über die Ratenkonstante der Konformationsänderung des beladenen Carriers hinaus, sodass letztere ratenlimitierend wird. Ähnlich ist es bereits in einem Energiediagramm nach Madej et al. formuliert [144, 146]. Die Energiebarriere für die Konformationsänderung des leeren Carriers wird durch  $\Delta\mu_{H^+}$  soweit reduziert, dass die Ratenkonstante des leeren Carriers größer wird als die des beladenen Carriers. Als Konsequenz wird unter Einfluss eines Membranpotentials am pH-Optimum die Konformationsänderung des beladenen Carriers ratenlimitierend (Abbildung 59d).

Dieses Modell für den Einfluss der äußeren Bedingungen (cs, pH, Substratspezies und Membranpotential) auf die ratenlimitierenden Reaktionen im Symport-Modus von LacY lässt sich möglicherweise auf alle PMF-gekoppelten Transporter übertragen, die nach dem *Alternating Access* Prinzip funktionieren. Die Ratenkonstanten der einzelnen Reaktionen unterscheiden sich zwar sehr wahrscheinlich bei verschiedenen Transportern, aber der Einfluss der verschiedenen äußeren Bedingungen auf die effektiven Raten bleibt derselbe.

## Ein pK-switch-Modell für *E.coli* Transporter

Das pH-Profil aller drei *E.coli* Transporter zeigt mindestens zwei apparente pK-Werte, die sich um mindestens 3 pH-Einheiten unterscheiden (Seite 103, Tabelle 19). Diese pK-Werte konnten der Protonenbindung in der auswärtsgerichteten Konformation (Seite 116, Abbildung 40) und der Protonenfreisetzung in der einwärtsgerichteten Konformation zugeordnet werden (Seite 115, Abbildung 39). Die analytische Lösung des minimalen kinetischen Modells (Seite 139, Tabelle 26) sowie die auf Basis der Strukturen berechneten pK-Werte (Seite A3, Tabelle 31) deuten auf eine signifikante reale pK-Verschiebung hin, die nur geringfügig niedriger ist als der Unterschied der apparenten pK-Werte (Seite 103, Tabelle 19).

Die für LacY elektrophysiologisch ermittelten apparenten pK-Werte, 7,5 für die Protonenfreisetzung und 10,9 für die Protonenbindung im Zucker-Influx (Seite 103, Tabelle 19), finden sich in der Literatur bestätigt. So zeigt LacY im Efflux-Experiment einen Protonenfreisetzung-pK-Wert von 8,5 [89] und in fluorometrischen Messungen infolge der Zuckerbindung einen Protonenaufnahme-pK-Wert von > 10,5 [164, 169]. Da jeder Transporter nur eine Protonenbindestelle aufweist (Seite 25f), muss im Zuge des Transportzyklus eine pK-Verschiebung stattfinden.

## Die Implementierung der pK-Verschiebung im MKM ist mit Problemen verbunden

Im MKM müssen die unterschiedlichen pK-Werte aufgrund der *Detailed Balance* durch asymmetrische Ratenkonstanten der Konformationsänderungen, entweder im leeren oder im beladenen Carrier, kompensiert werden (Seite 135, Abbildung 50). Mit den Annahmen, dass die

Konformationsänderungen ratenlimitierend sind, die Bindungsreaktionen allerdings schnelle Gleichgewichte darstellen, ergeben sich zwei Probleme.

- (1) **Extreme Ratenkonstanten:** pKa-Werte weit unterhalb des zytoplasmatischen pH-Wertes haben für die Transportrate nur einen geringen Nutzen, da die effektive Rate der Konformationsänderung des leeren Carriers nur noch geringfügig erhöht wird. Dem gegenüber steht die Erniedrigung der Ratenkonstanten ratenlimitierender Reaktionen im Influx aufgrund der *Detailed Balance* Bedingung. Die *Detailed Balance* wurde daher durch Erhöhung der Rückwärtsreaktion der Konformationsänderung im beladenen Carrier eingehalten. Es ergeben sich so realistische Influx-Raten. Aber die Rückwärtsratenkonstanten der Konformationsänderungen nehmen extrem hohe Werte an, insbesondere für XylE ([Seite 139, Tabelle 26](#))
- (2) **Asymmetrie in Influx und Efflux:** Für Influx und Efflux ergeben sich in den Szenarien BC und BLC unter physiologischen pH-Bedingungen stark asymmetrische Umsatzraten und KM-Werte ([Seite 136, Tabelle 25](#)). Dies steht im Widerspruch dazu, dass LacY als symmetrischer Transporter betrachtet wird, wie ausführlich auf [Seite 27f](#) beschrieben. Im LC-Szenarium ergibt sich zwar ein symmetrischer Transporter, die apparenten pK-Werte können aber aufgrund der schmalen pH-Profile nicht den experimentell bestimmten pK-Werten angepasst werden ([Seite 137, Abbildung 51](#)).

### ***Extreme Ratenkonstanten für globale Konformationsänderungen***

Die Erfüllung der *Detailed Balance* Bedingung führt im MKM dazu, dass der pK-switch die Umsatzrate im Influx gegenüber der im Efflux verlangsamt, statt Vorteile für den physiologischen Transportmodus zu vermitteln. Dies zeigt ein Vergleich zwischen XylE (pKa = 4,6) und einem hypothetischen Transporter mit einem pKa-Wert von 7,6. Der zytoplasmatische pH-Wert von *E.coli* wird bei pH 7,6 konstant gehalten [[85, 275](#)], sodass XylE in der einwärtsgerichteten Konformation zu etwa 100 % deprotoniert vorliegt. Der hypothetische Transporter hingegen liegt in der einwärtsgerichteten Konformation zu etwa 50 % im deprotonierten Zustand vor. XylE ermöglicht also aufgrund des niedrigeren pKa-Wertes im Vergleich zum hypothetischen Transporter über das vorgelagerte Gleichgewicht eine Beschleunigung der effektiven Rate der Konformationsänderung des leeren Carriers von 50 % auf 100 % der maximalen effektiven Rate. Ist der leere Carrier unter diesen Bedingungen ratenlimitierend, würde die Umsatzrate im Influx-Modus von XylE gegenüber der des hypothetischen Transporters verdoppelt werden. Dies repräsentiert den kinetischen Vorteil durch die pK-Verschiebung. Im Gegensatz dazu wird im MKM aufgrund der *Detailed Balance* Bedingung die Vorwärtsrate einer Konformationsänderung relativ zu ihrer Rückwärtsrate um drei Größenordnungen reduziert. Es ist wahrscheinlich, dass die Vorwärtsrate der entsprechenden Konformationsänderung

dadurch für den Influx-Modus ratenlimitierend wird. Im Influx-Modus steht die Verdopplung der effektiven Rate einer Konformationsänderung der Verlangsamung der Ratenkonstante einer Konformationsänderung um den Faktor 1.000 gegenüber. Die Umsatzrate im Influx-Modus wäre dadurch in XylE sehr wahrscheinlich langsamer als die des hypothetischen Transporters.

Dieses Problem wurde in den Simulationen umgangen, indem nur die Rückwärtsraten der Konformationsänderungen erhöht wurden, statt die Vorwärtsraten zu verlangsamen ([Seite 139](#), [Tabelle 26](#)). So ergeben sich sinnvolle Influx-Raten. Diese Anwendung der *Detailed Balance* Bedingung ist zwar formal korrekt, muss aber nicht notwendigerweise die Realität widerspiegeln. Es ergeben sich teilweise extrem hohe Ratenkonstanten für die Rückwärtsratenkonstante des beladenen Carriers, insbesondere in XylE ( $k_r = 10^6 \text{ s}^{-1}$ ). Die hohen Rückwärtsratenkonstanten sind ein wesentliches Argument gegen die topologisch asymmetrischen pK-Werte im MKM.

### ***Asymmetrie von Influx und Efflux***

Welche Konsequenzen hat der pK-switch für den Efflux-Modus? Wenn die *Detailed Balance* Bedingung auf die Rückwärtsrate des beladenen Carriers angewendet wird (BC-Szenarium, [Seite 136](#), [Tabelle 25](#)), ist die Konformationsänderung des leeren Carriers sowohl im Influx als auch im Efflux ratenlimitierend. Die Anpassung der Ratenkonstanten des beladenen Carriers ( $k_f$ ,  $k_r$ ) durch die *Detailed Balance* Bedingung hat keinen Einfluss auf die Umsatzrate im Influx oder Efflux, weil sowohl  $k_f$  ( $250 \text{ s}^{-1}$ ) als auch  $k_r$  ( $> 250 \text{ s}^{-1}$ ) schneller sind als die jeweilige Ratenkonstante des leeren Carriers ( $j_f = j_r = 50 \text{ s}^{-1}$ ). Werden jedoch die Ratenkonstanten der ratenlimitierenden Konformationsänderung durch Anwendung der *Detailed Balance* Bedingung angepasst, so wäre der Efflux-Modus gegenüber dem Influx-Modus beschleunigt ( $j_f = 50 \text{ s}^{-1}$ ,  $j_r > 50 \text{ s}^{-1}$ , LC-Szenarium, siehe [unten](#)).

Einen nachteiligen Einfluss auf die Umsatzrate im Efflux-Modus haben jedoch unabhängig von der Anwendung der *Detailed Balance* Bedingung die topologisch asymmetrischen pK-Werte. Wie im vorangegangenen Abschnitt soll ein hypothetischer Transporter, diesmal mit einem pK<sub>b</sub>-Wert von 7,6, mit den *E.coli* Transportern (pK<sub>b</sub> ≈ 11) verglichen werden. Für die Umsatzrate im Efflux-Modus spielt das Protonierungsgleichgewicht im auswärtsgerichteten Carrier, also der pK<sub>b</sub>-Wert die entscheidende Rolle. Als vorgelagertes Gleichgewicht beeinflusst der pK<sub>b</sub>-Wert die effektive Rate der ratenlimitierenden Konformationsänderung im leeren Carrier. Aufgrund des hohen pK<sub>b</sub>-Wertes liegen bei physiologischem pH-Wert weniger als 0,1 % der Transporter deprotoniert vor, was die effektive Rate der Konformationsänderung des leeren Carriers um mehrere Größenordnungen reduziert. Im Gegensatz dazu würde im hypothetischen Transporter (pK<sub>b</sub> = 7,6) die effektive Rate der Konformationsänderung nur um einen Faktor 2 von der maximalen effektiven Rate abweichen. Es ist anzumerken, dass die extrem hohen pK<sub>b</sub>-Werte der *E.coli* Transporter in diesem Modell physiologisch betrachtet Sinn machen. So wird die Efflux-Rate gegenüber der Influx-Rate bei pH 7,6

herabgesetzt. Aufgrund der niedrigen effektiven Rate der ratenlimitierenden Reaktion ist auch der KM-Wert im Efflux-Modus erheblich reduziert; der *steady-state* ist wesentlich früher gesättigt als die Zuckerbindungsreaktion. Die Simulationen im BC- und BLC-Szenarium bestätigen, dass bei pH 7,6 die Umsatzrate im Efflux gegenüber der im Influx verlangsamt ist und gleichzeitig ein signifikant niedrigerer KM-Wert im Efflux resultiert (*Seite 136, Tabelle 25*). In der Literatur werden die Eigenschaften der Zuckerbindung und die Umsatzzraten in Influx und Efflux bei physiologischen pH-Bedingungen zumindest für LacY als symmetrisch beschrieben (*Seite 27f*). Die Asymmetrie von Influx und Efflux sprechen daher gegen das MKM als vollständiges Modell für den Zuckertransport in LacY und wahrscheinlich auch aller anderen untersuchten MFS-Transporter.

Ein hinsichtlich Influx- und Efflux-Raten sowie KM-Werten symmetrischer Transporter ergibt sich, wenn die *Detailed Balance* Bedingung ausschließlich auf die Rückwärtsrate des leeren Carriers angewendet wird (LC-Szenarium, *Seite 136, Tabelle 25*). Durch Erhöhung der Rückwärtsrate der ratenlimitierenden Konformationsänderung im leeren Carrier wird der Efflux-Modus gegenüber dem Influx-Modus begünstigt. Gleichzeitig verlangsamt der basische pKb-Wert die effektive Rate des leeren Carriers im Efflux-Modus (siehe *oben*). Beide Effekte gleichen sich aus, sodass die effektiven Raten in Influx und Efflux identisch sind. Das LC-Szenarium wurde jedoch aufgrund eines weiteren Problems nicht weiter verfolgt. Das simulierte pH-Profil ist sehr schmal (*Seite 137, Abbildung 51*). Die experimentell bestimmten pK-Werte, die ein sehr breites pH-Profil fordern (*Seite 102, Abbildung 34*), können im LC-Szenarium nicht simuliert werden.

### ***Das Problem der topologischen Zuordnung der pK-Werte***

Experimentelle Daten zeigen, dass die unterschiedlichen apparenten pK-Werte und insbesondere auch die verschiedenen  $\Delta pK = pK_b - pK_a$  der *E.coli* Transporter keinen Einfluss auf die Transportrate haben. Wo sich  $\Delta pK$  bei den Transportern unterscheiden, bleiben die Umsatzzraten gemessen an den Peakströmen am pH-Optimum in etwa identisch. Eine größere pK-Verschiebung hat weder positive noch negative Konsequenzen für die Umsatzrate. Die  $v_{max}$ -Werte am pH-Optimum aller Transporter liegen im Durchschnitt zwischen 1 nA und 2 nA (*Seite 82, Tabelle 14*), während  $\Delta pK$  der Transporter zwischen 3 (FucP) und 5 (XylE) variiert (*Seite 103, Tabelle 19*). Insbesondere der pKa-Wert variiert stark zwischen XylE (4,6), FucP (6,3) und LacY (7,5) (*Seite 103, Tabelle 19*), während der pHi in *E.coli* mit pH = 7,6 konstant ist [*85, 268, 275*]. Ähnlich verhält es sich mit den pKb-Werten (10,9 für LacY, 10,6 für XylE), die viel größer sind als pH 9,5, bei dem *E.coli* nicht mehr überlebensfähig ist [*258*]. Es gibt also sehr wahrscheinlich keinen evolutionären Selektionsdruck auf die pK-Werte. Eine Minimierung der pK-Verschiebung bietet keinen evolutionären Vorteil. Dass die pK-Verschiebung keinen Einfluss auf die Umsatzrate hat, spricht für die Anwendung der *Detailed Balance* Bedingung im MKM auf die Rückwärtsrate der nicht-ratenlimitierenden Konformationsänderung

(BC-Szenarium). Es bleiben die sich ergebenden hohen Ratenkonstanten der Konformationsänderung und die resultierende Asymmetrie für Influx und Efflux. Das MKM beschreibt damit nicht alle Parameter des Transportmechanismus korrekt.

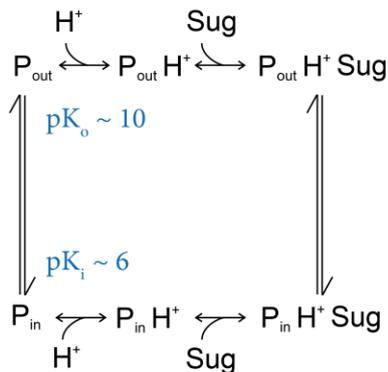
Möglicherweise ist die Zuordnung der pKa- und pKb-Werte der Schlüssel zum Verständnis des pK-switch-Mechanismus. Die Zuordnung der pKa- und pKb-Werte zur intraliposomalen Protonenfreisetzungs- und extraliposomalen Protonenbindungs-Reaktion im MKM erfolgte auf Basis von Zuckergradienten-getriebenen Influx-Experimenten ([Seite 115f](#), [Abbildung 39](#), [Abbildung 40](#)). Möglicherweise ergäbe sich im Efflux eine genau umgekehrte Zuordnung der pK-Werte, sodass der pKa-Wert mit der Protonenfreisetzung im auswärtsgerichteten Zustand und der pKb-Wert mit der Protonenbindung im einwärtsgerichteten Zustand korrelieren würde. Diese Möglichkeit wird im MKM nicht berücksichtigt. Hier sind die pK-Werte unabhängig von der Transportrichtung topologisch mit der peri- und zytoplasmatischen Seite verbunden, sodass das MKM zunächst nur für den Influx-Modus Gültigkeit hat. Die Eigenschaften des Efflux-Modus können im SSM-Experiment nicht untersucht werden, weil das intraliposomale Volumen nicht direkt zugänglich ist.

Möglicherweise ist die *Detailed Balance* Bedingung in der Natur über andere Reaktionen realisiert, die nicht im MKM berücksichtigt sind. Dadurch könnte es möglich sein, dass die pK-Werte nicht topologisch, sondern abhängig von der Transportrichtung definiert sind. Am Ende dieses Abschnittes wird ein molekulares Modell für den pK-switch vorgestellt, das die *Detailed Balance* Bedingung über schnellere, lokale Konformationsänderungen einführt, die nicht im MKM berücksichtigt sind ([Seite 188](#), [Abbildung 61](#)).

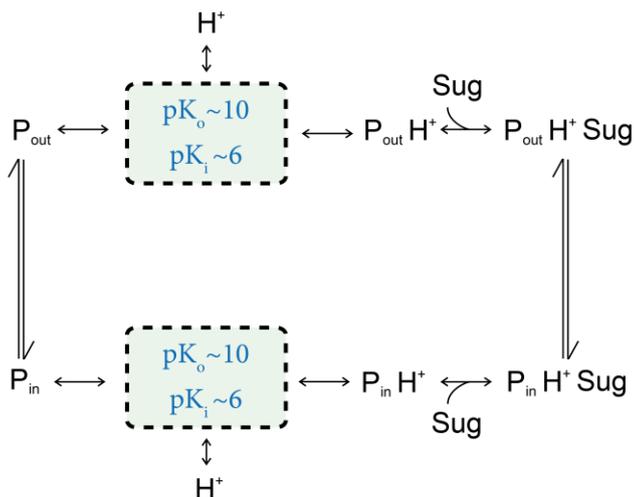
## Ein symmetrisches Transportmodell

Die Problematiken der unterschiedlichen Transporteigenschaften in Influx und Efflux sowie der extremen Ratenkonstanten der Konformationsänderungen lässt sich durch das Einführen zusätzlicher Reaktionen in das kinetische Modell umgehen. Wenn die pK-Verschiebung durch lokale Konformationsänderungen erklärt wird, die in allen im MKM berücksichtigten Konformationen stattfinden könnten, würden die pK-Werte nicht mehr mit der peri- und zytoplasmatischen Seite des Transporters assoziiert sein, sondern den pK-Werten der Protonenbindung und Protonenfreisetzung entsprechen. Die pK-Werte sind nicht mehr spezifisch für die Seite des Transporters, sondern abhängig von der Transportrichtung ([Abbildung 60](#)). In diesem Szenario resultiert ein symmetrischer Transporter. Die Transporteigenschaften für Influx und Efflux wären sehr ähnlich. Ein geringer Unterschied der apparenten pK-Werte könnte sich im Influx und Efflux aufgrund verschiedener Ratenkonstanten beider Konformationsänderungen ( $50 \text{ s}^{-1}$  und  $250 \text{ s}^{-1}$ ) ergeben. Experimentelle Hinweise auf leicht asymmetrische pK-Werte im Influx (7,5) und Efflux (8,5) gibt es bereits ([Seite 27f](#)).

(a) Asymmetrische pK-Werte im MKM



(b) Symmetrisches pK-switch Modell



**Abbildung 60: Vergleich des MKM mit asymmetrischen pK-Werten mit einem symmetrischen Transportmodell.** (a) Minimales kinetisches Modell mit topologisch definierten pK-Werten (Seite 61, Abbildung 18). Der  $pK_o$ -Wert ist mit der periplasmatischen Seite, der  $pK_i$ -Wert ist mit der zytoplasmatischen Seite des Transporters verbunden. (b) Hypothetisches kinetisches Modell unter Berücksichtigung asymmetrischer Aufnahme- und Abgabe-pK-Werte, die nicht topologisch, sondern durch die Transportrichtung definiert sind. Die pK-Verschiebung könnte in diesem Modell durch lokale Konformationsänderungen erfolgen, die sehr wahrscheinlich in jedem Zustand des Transporters stattfinden können (Seite 188, Abbildung 61). Die Darstellung ist daher nur als Schema zu verstehen. Im Zucker gebundenen und okkludierten Zustand spielt der pK jedoch keine Rolle, da die Protonenbindestelle nicht zugänglich für das wässrige Medium ist. Die Boxen enthalten Konformere mit  $pK \sim 10$  und  $pK \sim 6$ , die in einem schnellen Gleichgewicht zueinander stehen. Dabei ist der  $pK \sim 10$  immer der Aufnahme-pK-Wert und der  $pK \sim 6$  immer der Abgabe-pK-Wert. Die pK-Werte sind exemplarisch und orientieren sich an den Mittelwerten der experimentell bestimmten pK-Werte für LacY, FucP und XylE.

Ein symmetrisches Transportmodell wurde für LacY bereits in der Literatur angedeutet [125]. Hier besteht jedoch das Problem der Formulierung eines einfachen kinetischen Modells. Sowohl in der einwärtsgerichteten als auch in der auswärtsgerichteten Konformation müssen je nach Transportrichtung die Transporter den  $pK_i$ -Wert oder den  $pK_o$ -Wert annehmen können. Um dies zu realisieren, ist ein Mechanismus erforderlich, der Protonenbindung und Protonenfreisetzung mechanistisch voneinander trennt. Die Formulierung eines konkreten kinetischen Modells ist daher schwierig. Es konnte jedoch mithilfe der verfügbaren 3D-Strukturen und theoretischer pK-Kalkulationen (Seite A3, Tabelle 31) ein molekularer Mechanismus für den Zucker-Protonen Cotransport entwickelt werden, der die pK-Verschiebungen unter Erhalt der Transportsymmetrie für alle drei *E.coli* Transporter gemäß des beschriebenen Modells erklärt, wie im folgenden Abschnitt ausgeführt wird.

Ein zentrales Element des symmetrischen Modells bleibt jedoch ungeklärt. Der Auslöser für die pK-Verschiebung konnte nicht identifiziert werden. Im MKM ist die pK-Verschiebung mit den strukturellen Änderungen im Zuge der Konformationsänderungen verknüpft, die ihrerseits induziert werden durch Zuckerbindung im auswärtsgerichteten bzw. Protonenfreisetzung im einwärtsgerichteten Carrier. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der pK-Verschiebung im

symmetrischen Modell vielmehr um ein schnelles Gleichgewicht lokaler Konformationsänderungen. Damit ist ein zusätzliches Problem verbunden: Wie wird nach Deprotonierung im *steady-state* verhindert, dass das schnelle Gleichgewicht der pK-Verschiebung die Erhöhung des pK-Wertes und damit eine direkte Reprotonierung induziert, statt die langsame Konformationsänderung des leeren Carriers? Möglicherweise wird dies indirekt über die Zuckerbindung außen reguliert: Im *steady-state* zieht die Zuckerbindung über das nachgeschaltete Gleichgewicht den Transporter in die einwärtsgerichtete deprotonierte Konformation.

### **Ein molekularer pK-switch-Mechanismus im symmetrischen Modell**

Die Formulierung eines symmetrischen kinetischen Modells, das die asymmetrischen pK-Werte berücksichtigt, hat sich als schwierig herausgestellt. Auf Basis der 3D-Strukturen konnte in Zusammenarbeit mit Gregor Madej jedoch ein möglicher molekularer Mechanismus für den pK-switch gefunden werden. Methode und Ergebnisse der zugrunde liegenden pK-Kalkulationen sind im Anhang auf [Seite A1f](#) beschrieben. Der entsprechende Mechanismus ermöglicht ein symmetrisches Transportverhalten. So hat gemäß der [Abbildung 60](#) jeder Transporter sowohl in der einwärtsgerichteten als auch in der auswärtsgerichteten Konformation einen Protonenaufnahme-pK-Wert und einen Protonenabgabe-pK-Wert. Über eine lokale Konformationsänderung stehen diese zwei Zustände in einem schnellen Gleichgewicht zueinander. In diesem Abschnitt ist der Mechanismus für LacY beschrieben, während im Anhang auf [Seite A21f](#) eine Übertragung des Mechanismus auf FucP, XylE und GlcP erfolgt. Diese Übertragung ist aufgrund homologer Aminosäure-Positionen möglich, die mithilfe der 3D-Strukturen identifiziert werden konnten [\[102, 143–145\]](#). Es ist anzumerken, dass der im Folgenden beschriebene Mechanismus sehr spekulativ ist. Er basiert hauptsächlich auf lokalen Konformationen der gelösten 3D-Strukturen sowie Korrelationen zwischen theoretisch berechneten und experimentell bestimmten pK-Werten.

In der Literatur wird für die pK-Verschiebung in LacY R302 oder ein Wassermolekül verantwortlich gemacht [\[287, 288\]](#). Theoretische pK-Berechnungen auf Basis der 3D-Strukturen zeigen jedoch, dass eine elektrostatische Kopplung zwischen H322 und E325 die pK-Verschiebung in LacY induziert. Die Ergebnisse der empirischen pKa-Vorhersage zeigen, dass die pK-Werte von H322 in verschiedenen Konformationen gut mit den experimentell bestimmten pK-Werten für die Protonenaufnahme und die Protonenabgabe übereinstimmen ([Seite A3, Tabelle 31](#)).

In dem beschriebenen Modell wird der einwärtsgerichtete Zustand als Grundzustand angenommen ([Abbildung 61, Zustand 1](#)), konsistent mit der Interpretation der Struktur-Daten in der Literatur [\[124, 130\]](#). In diesem Zustand ist die Protonenbindestelle E325 protoniert. H322-δN ist Wasserstoffbrückenakzeptor für Y236-OH, wie aus der 3D-Struktur mit der PDB-ID 2CFQ hervorgeht.

Unter diesen Voraussetzungen ergeben sich den Berechnungen zufolge pK-Werte für E325 und H322 von 8,8 bzw. 3,3. Ausgehend von diesem Grundzustand können sowohl Deprotonierung (Influx) als auch Zuckerbindung (Efflux) stattfinden. Im Folgenden ist der Transportzyklus für den Zucker-Influx beschrieben, beginnend mit der Deprotonierung des einwärtsgerichteten LacY-Konformers.

Die Deprotonierung könnte eingeleitet werden, indem H322- $\delta$ N die Interaktion mit Y236-OH bricht und mit E325 wechselwirkt. Eine solche lokale Konformation ist in der 3D-Struktur mit der PDB-ID 4OAA zu erkennen. Aus den Rechnungen ergeben sich pK-Werte für E325 und H322 von 5,8 bzw. 7,2. Das Proton kann von E325 auf His322- $\delta$ N übertragen werden (*Zustand 2*). Die Deprotonierung des Transporters erfolgt dann ausgehend von H322- $\epsilon$ NH auf ein Wassermolekül innerhalb der Kavität, das durch E269 stabilisiert wird (*Zustand 3*). Der pK-Wert von 7,2 für die Deprotonierung über H322 beeinflusst damit das vorgelagerte Gleichgewicht der Konformationsänderung des leeren Carriers und stimmt gut mit dem aus den kinetischen Simulationen erhaltenen pKi-Wert von 7,6 überein (*Seite 139, Tabelle 26*).

Im unprotonierten Zustand bleibt die Wasserstoffbrücke zwischen H322- $\delta$ NH und der Carboxylgruppe von E325 bestehen. Gleichzeitig wird die negative Ladung an E325 durch die positive Ladung von R302 stabilisiert (*Zustand 4*). Im Grundzustand, also wenn E325 protoniert ist, ist R302 über eine Salzbrücke an D240 gebunden. Ist E325 negativ geladen, so orientiert sich R302 in Richtung E325, während D240 mit K319 über eine Salzbrücke interagiert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass R302 die Deprotonierung im Zuge des Transportzyklus erleichtert [287]. So zeigt R302A LacY kein *steady-state* Signal, aber ein *pre steady-state* Signal auf der SSM [281]. In der Mutante ist der unprotonierte Zustand von E325 instabil. Es findet keine Protonenfreisetzung mehr statt. Auf analoge Weise lassen sich die Phänotypen der D240 und K319 Mutanten von LacY erklären [289].

Es folgt die Konformationsänderung des leeren Carriers. Während oder nach der Konformationsänderung erfolgt eine Reorientierung von H322, die mit einer weiteren pK-Verschiebung einhergeht. Aus den Rechnungen ergeben sich für E325 und H322 pK-Werte von 5,4 bzw. 9,8. Diese Reorientierung darf nicht vor der Konformationsänderung des leeren Carriers erfolgen. So wird verhindert, dass nach der Deprotonierung mit dem pK-Wert 7,2 direkt die erneute Reprotonierung mit dem pK-Wert 9,8 erfolgt. Es ist jedoch unklar welcher Mechanismus sicherstellt, dass die Reorientierung von H322 langsamer ist als die Konformationsänderung des leeren Carriers.

Mit dem pK-Wert von 9,8 erfolgt anschließend die Protonierung von H322 im auswärtsgerichteten Zustand (*Zustand 5*). Ein Hydroxoniumion, das durch E269 innerhalb der Kavität stabilisiert wird, fungiert dabei als Protonendonator für H322- $\epsilon$ N. Der berechnete pK-Wert für H322 von 9,8 stimmt

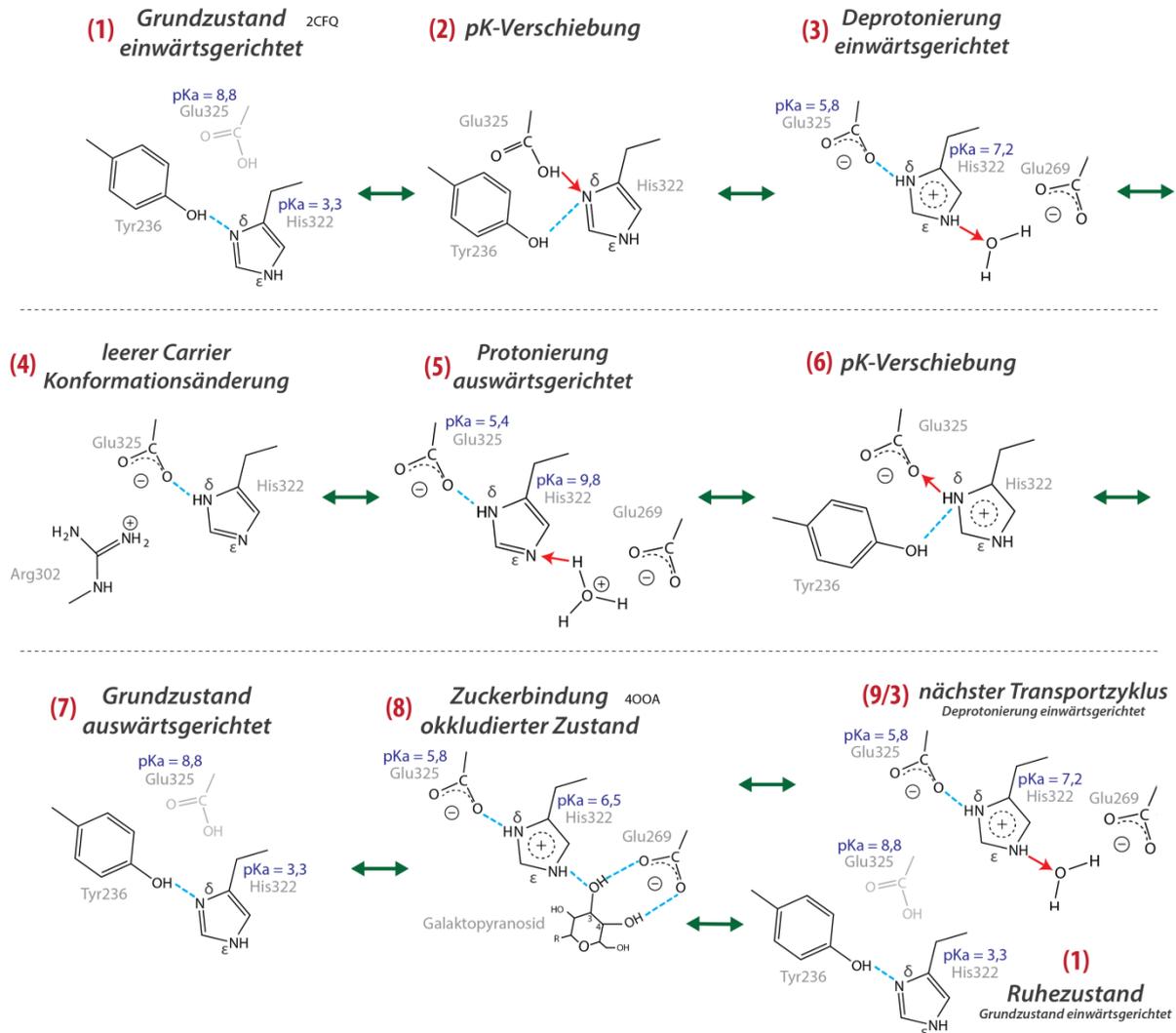
sehr gut mit dem aus den kinetischen Simulationen erhaltenen pK<sub>o</sub>-Wert überein, der sich zu 9,5 ergibt (*Seite 139, Tabelle 26*). Damit fungiert H322-εN als primärer Protonenakzeptor.

Der auswärtsgerichtete Grundzustand wird gebildet, indem das Proton von H322-δNH auf E325 übertragen wird. Dazu ist eine pK-Verschiebung erforderlich. Die Annäherung von Y236 an H322 könnte die pK-Verschiebung einleiten und den Protonentransfer von H322 auf E325 induzieren (*Zustand 6*). Es handelt sich um die genau entgegengesetzte pK-Verschiebung, die zur Auflösung des einwärtsgerichteten Grundzustandes (*Zustand 2*) beiträgt. Im auswärtsgerichteten Grundzustand (*Zustand 7*) interagiert dann wieder H322-δN mit Y236-OH. Es ergeben sich wie im einwärtsgerichteten Grundzustand pK-Werte für E325 und H322 zu 8,8 bzw. 3,3. In diesem Zustand verharrt LacY, bis ein Zuckermolekül bindet oder alternativ durch Interaktion von E325 mit H322 die erneute Deprotonierung mit einem pK-Wert von 7,2 stattfindet. Der auswärtsgerichtete Grundzustand befindet sich in einem dynamischen Gleichgewicht mit dem einwärtsgerichteten Grundzustand. Die Deprotonierung erfolgt in beiden Grundzuständen mit einem pK-Wert von 7,2. Die pK-Werte sind nicht topologisch definiert, sondern abhängig von der Transportrichtung.

In beiden Grundzuständen kann die Bindung eines Zuckermoleküls erfolgen (*Zustand 8*). Eine Zuckerbindungs-induzierte Konformationsänderung fördert die Interaktion zwischen E325 und H322, was gleichzeitig zur Verschiebung der entsprechenden pK-Werte von 8,8 bzw. 3,3 auf 5,8 bzw. 6,5 führt. Dies resultiert direkt aus den 3D-Strukturen mit den PDB-IDs 2CFQ und 4OAA. Die Zuckerbindung treibt den Transport an, indem die Protonierungs- und pK-switch-Gleichgewichte in Richtung auswärtsgerichteten Grundzustand verschoben werden. Die Änderung der pK-Werte infolge der Zuckerbindung zeigt, dass durch die Interaktion mit dem Zucker sehr wahrscheinlich das Proton von E325 auf H322-δN übertragen wird, sodass ein positiv geladener Histidyl-Rest entsteht. Ein möglicher interner Protonentransfer zwischen E325 und H322 wurde bereits postuliert [124]. Auch konnte eine Zucker-induzierte interne Protonentransferreaktion bereits durch einen kinetischen Isotopeneffekt der Zuckerbindung in D<sub>2</sub>O detektiert werden [176]. In diesem Zustand findet die Konformationsänderung des beladenen Carriers statt. H322-εNH interagiert mit dem Zucker, während H322-δNH Wasserstoffbrückendonator für die negativ geladene Carboxylgruppe von E325 darstellt.

Vor der Protonenfreisetzung erfolgt sehr wahrscheinlich die Zuckerfreisetzung. Erst nach der Zuckerfreisetzung kann in der Nähe von E269, dessen zwei Sauerstoffatome zuvor den Zucker koordiniert haben [225], ein Wassermolekül binden (*Zustand 9/3*). Dadurch erhöht sich der pK-Wert von H322 durch Kontakt mit Wasser leicht von 6,5 auf 7,2; der pK-Wert von E325 bleibt unbeeinflusst. Von diesem Zustand aus erfolgt wieder die Deprotonierung, um einen zweiten Reaktionszyklus einzuleiten. Wenn kein weiterer Zyklus gestartet wird, zerfällt der einwärtsgerichtete

protonierte Zustand mit einem pK-Wert von 7,2 an H322 wieder in den Grundzustand zurück (*Zustand 1*). H322- $\delta$ N interagiert dann wieder mit Y236-OH und die pK-Werte von E325 und H322 sind 8,8 bzw. 3,3.



**Abbildung 61: Molekularer Mechanismus für den PMF-gekoppelten Zuckertransport in LacY.** Die angegebenen pK-Werte wurden durch empirische pK-Berechnung auf Basis der Kristallstrukturmodelle ermittelt (*Seite A1f*). Die pK-Werte für Protonenbindung und Protonenfreisetzung stimmen gut mit den experimentell bestimmten und im MKM simulierten pK-Werten überein (*Seite A3, Tabelle 31*). Die Zustände des Transporters sind durchnummeriert. Die Beschreibung im Text bezieht sich auf diese Zustände.

## Das Problem der Orientierung

Die asymmetrischen pK-Werte können im Allgemeinen wie oben diskutiert auf zwei Arten interpretiert werden. Die lokalen Strukturen der einwärtsgerichteten und auswärtsgerichteten Konformationen könnten die pK-Werte diktieren; Sie wären dann topologisch definiert, wie im 6-Zustands-Modell angenommen (*Seite 184, Abbildung 60a*). Oder die pK-Werte sind abhängig von der Transportrichtung, d.h. beide pK-Werte können in beiden Konformationen vorliegen, je nachdem ob Influx oder Efflux katalysiert wird (*Seite 184, Abbildung 60b*). LacY wird als symmetrisch

funktionierender Transporter angenommen: Für Efflux und Influx wurden sehr ähnliche Transport-Eigenschaften gefunden (*Seite 27f*). Dies deutet auf Transportrichtungs-abhängige pK-Werte hin. Ein entsprechender Mechanismus ist in *Abbildung 61* beschrieben. Für FucP und XylE gibt es jedoch keine Untersuchungen hinsichtlich der Symmetrieeigenschaften.

Ein generelles Problem bei der Untersuchung der Transporter-Symmetrie stellt die Orientierung der Transporter innerhalb der PM dar. Je nachdem, ob die pK-Werte topologisch (asymmetrisches Transporter-Verhalten) oder durch die Transportrichtung (symmetrisches Transporter-Verhalten) definiert sind, hat die Orientierung Konsequenzen für die experimentellen Ergebnisse oder nicht. Die genaue Orientierung der Transporter innerhalb der Membran nach Rekonstitution ist nicht bekannt. Für LacY scheint in Proteoliposomen mit über 85 % eine *rso* Orientierung vorzuherrschen [*290*]. Für FucP konnten ebenso Hinweise auf eine dominierende *rso* Orientierung gefunden werden (*Seite A19, Abbildung 71*). Vergleichende Daten für XylE und GlcP sind nicht verfügbar.

Da alle Transporter auf ähnliche Weise rekonstituiert wurden, liegt es nahe, dass FucP und XylE genauso wie LacY orientiert in die Membran eingebaut wurden. Zudem gibt es keine Evidenzen für zwei Transporter-Populationen mit verschiedenen Orientierungen. Modellrechnungen auf Basis des 6-Zustands-Modells mit verschiedenen pK-Werten für die einwärtsgerichtete und auswärtsgerichtete Konformation zeigen bei einer gemischten Orientierung zwei pK-Werte bei pH-Werten unterhalb des pH-Optimums (*Daten nicht gezeigt*). Tatsächlich werden jedoch für alle Transporter Titrationskurven mit nur einem pKa-Wert gefunden (*Seite 102, Abbildung 34*). Sollten alle Transporter symmetrisch funktionieren, wäre die Orientierung ohnehin kein Problem. Titrationskurven mit nur einem pK-Wert würden sowohl in Proben mit gemischter Orientierung als auch in orientierten Proben erhalten werden. In diesem Szenario sind die pK-Werte abhängig von der Transportrichtung. Da in allen Fällen der Influx-Modus betrachtet wird, wären Vergleiche ohne Einschränkung möglich.

In jedem Fall liegt eines der beiden folgenden Szenarien vor. In beiden Fällen sind die abgeleiteten pK-Werte korrekt, müssen jedoch unterschiedlich interpretiert werden. (1) Die Transporter sind gemischt orientiert in Proteoliposomen eingebaut. Dann können die pK-Werte aufgrund der gemessenen Titrationskurven nicht topologisch definiert sein. Die Transporter müssen hinsichtlich der Transportrichtung symmetrische Transporteigenschaften aufweisen. Die pK-Werte sind gemäß des symmetrischen Transportmodells (*Seite 184, Abbildung 60b*) zu interpretieren. (2) Alle Transporter sind orientiert in Proteoliposomen eingebaut. Die pK-Werte könnten gemäß einer symmetrischen Transporter-Funktion von der Transportrichtung abhängig sein (*Seite 184, Abbildung 60b*). Ein asymmetrisches Transporter-Verhalten und topologisch definierte pK-Werte (*Seite 184, Abbildung 60a*) wären in diesem Szenario allerdings experimentell nicht auszuschließen.

## Die Flusskopplung in GlcP und den *E.coli* Transportern unterscheidet sich

In der Einleitung wurden die theoretischen Voraussetzungen für einen idealen Symporter und einen idealen Antiporter gegenübergestellt ([Seite 13f](#)). Mit GlcP konnte gezeigt werden, dass ein und derselbe Transporter dazu in der Lage ist Symport und Antiport zu katalysieren ([Seite 124, Abbildung 45](#)). Da sich die in der Einleitung beschriebenen Flusskopplungsmechanismen für Symporter und Antiporter gegenseitig ausschließen, können Flusskopplungsmechanismen alleine nicht erforderlich sein, damit ein Transporter so funktioniert, wie er funktionieren soll. Die äußeren Bedingungen *in vivo* diktieren den Transportmodus und haben viel größeren Einfluss als intrinsische Flusskopplungsmechanismen.

### Das Mysterium des idealen Symporters

GlcP und die *E.coli* Transporter LacY, FucP und XylE zeigen in verschiedenen Experimenten wesentliche Unterschiede. Diese weisen darauf hin, dass sich die Flusskopplung in GlcP strikt von der in den *E.coli* Transportern unterscheidet. Dennoch sind alle vier Transporter in der Literatur als PMF-gekoppelte Symporter klassifiziert. Wie lässt sich dieser mögliche Widerspruch lösen?

#### ***GlcP und die E.coli Transporter zeigen wesentliche Unterschiede***

GlcP und die drei *E.coli* Transporter unterscheiden sich maßgeblich voneinander. Das betrifft die pH-Abhängigkeit der  $K_M$ -Werte, die Ratenkonstanten der Konformationsänderungen im unprotonierten, Zucker-gebundenen Zustand und die Wirkung eines pH-Gradienten auf die Umsatzrate sowie den Transportmodus. In LacY, FucP und XylE erhöht die Protonierung die Affinität zum Zucker ([Seite 82, Tabelle 14](#)), ein Charakteristikum des idealen Symporters. Für GlcP ist die Affinität zum Zucker im unprotonierten Zustand erhöht ([Seite 121, Tabelle 22](#)), eine Eigenschaft des idealen Antiporters. Ein Vergleich zwischen der pH-Abhängigkeit der *pre steady-state* Signale in *E.coli* Transportern und GlcP zeigt, dass nur in GlcP die Konformationsänderung des beladenen Carriers im unprotonierten Zustand (PS) möglich ist. Nur in GlcP ergibt sich für  $\text{pH} > \text{pK}_b$  ein *pre steady-state* Signal mit negativem Vorzeichen ([Seite 118, Abbildung 41](#)), nicht aber in den *E.coli* Transportern ([Seite 106, Abbildung 36](#)). Diese Konformationsänderung könnte es GlcP ermöglichen Antiport zu katalysieren, während in den *E.coli* Transportern das Fehlen dieser Konformationsänderung bestätigt, dass es sich um Symporter und keine Antiporter handelt.

Im elektrophysiologischen Experiment wird für GlcP im Gegensatz zu LacY, FucP und XylE nach Zuckersprung kein elektrogener stationärer Transport beobachtet ([Seite 118, Abbildung 41](#)). Die Symport-Aktivität ist unter alleinigem Einfluss eines Zuckergradienten daher um mindestens ein bis zwei Größenordnungen langsamer als die der *E.coli* Transporter. Hierfür gibt es zunächst zwei mögliche Erklärungen. Zum einen könnte die Transportrate in GlcP im Allgemeinen sehr niedrig sein,

z.B. aufgrund einer sehr langsamen Konformationsänderung im leeren Carrier. Oder GlcP katalysiert unter alleinigem Einfluss eines Zuckergradienten elektroneutralen Uniport, der elektrophysiologisch nicht detektiert werden kann. Für eine endliche Uniport-Rate spricht die Zucker-Austausch-Aktivität, welche im Bereich des  $pK_b$ -Wertes vom pH-Wert unabhängig ist ([Seite 125, Abbildung 46](#)). Sie zeigt, dass Protonen- und Zuckertranslokation nicht strikt gekoppelt sind und die Energiebarriere für die Konformationsänderung des Zucker-gebundenen Carriers (PS oder PSH) sehr wahrscheinlich unabhängig vom Protonierungszustand ist.

Wenn also die Konformationsänderungen des Substrat-gebundenen (PS) und des Substrat-freien Carriers (P) im unprotonierten Zustand möglich sind, katalysiert GlcP im pH-Bereich  $> pK_b$  in Anwesenheit eines Zuckergradienten Uniport. Auf [Seite 153f](#) ist beschrieben, dass auch die *E.coli* Transporter Uniport katalysieren, und zwar durch die Konformationsänderungen des Substrat-gebundenen (PSH) und des Substrat-freien Carriers (PH) im protonierten Zustand. Damit sind zwei Reaktionszyklen beschrieben, die eine endliche Uniport-Rate ermöglichen. Die Flusskopplung ist damit bei allen untersuchten Transportern nicht perfekt, weshalb diese Konformationsänderungen im 8-Zustands-Modell berücksichtigt wurden ([Seite 150, Abbildung 54](#)).

Das *Counterflow*-Experiment für GlcP zeigt eine pH-Abhängigkeit ([Seite 125, Abbildung 46](#)) [133]. Dies ist ein Hinweis darauf, dass GlcP auch PMF-gekoppelten Efflux katalysiert. GlcP katalysiert daher nicht ausschließlich Uniport, sondern auch Symport. Das Verhältnis zwischen Symport und Uniport ist sehr wahrscheinlich abhängig von den äußeren Bedingungen. Ein einwärtsgerichteter pH-Gradient führt im SSM-Experiment dazu, dass die Symport-Aktivität in GlcP erhöht wird ([Seite 124, Abbildung 45](#)). Interessanterweise bestimmt die Richtung des pH-Gradienten in wt GlcP den Transport-Modus. Ein auswärtsgerichteter pH-Gradient induziert bei Zuckersprung Antiport. Dieser erfolgt dabei etwa um eine Größenordnung schneller als der Symport ([Seite 124, Abbildung 45e,f](#)), was die mit dem pH-Wert steigende Affinität zum Zucker bereits vermuten ließ. Im Gegensatz zu GlcP bewirkt ein pH-Gradient bei den *E.coli* Transportern keine Beschleunigung des elektrogenen Transports, wie im Abschnitt auf [Seite 112f](#) erläutert.

Auch unter Einfluss eines Membranpotentials ist die Symport-Aktivität in GlcP höher. Im Potential-getriebenen *Uptake*-Experiment katalysiert GlcP [133] PMF-gekoppelten Transport, der nur um bis zu eine Größenordnung langsamer ist als der in LacY [280] und XylE [132]. In GlcP sind Uniport, Symport und Antiport konkurrierende Transportmoden. Die *E.coli* Transporter hingegen sind sehr wahrscheinlich nur in der Lage Symport und unter extremen Bedingungen Uniport zu katalysieren.

### ***GlcP und E.coli Transporter wurden als Symporter klassifiziert***

Der vorangehende Abschnitt zeigt, dass sich die Symporter LacY, FucP und XylE strikt von dem fakultativen Antiporter GlcP unterscheiden. Wie konnte GlcP in der Literatur als Symporter klassifiziert werden? Das Problem besteht darin, dass eine Transportaktivität im *Uptake*-Experiment oft als hinreichende Rechtfertigung für die Klassifizierung akzeptiert wird. Zeigt die Zucker-Akkumulierung eine Abhängigkeit von  $\Delta\mu_{H^+}$ , so wird der Transporter als PMF-gekoppelter Symporter klassifiziert. Damit ist jedoch nur gezeigt, dass ein innen negatives Membranpotential den Symport-Modus beschleunigt. Dies schließt nicht aus, dass unter alleinigem Einfluss eines Zuckergradienten der Uniport-Modus dominiert oder bei umgekehrten Substratgradienten auch Antiport katalysiert wird. Prinzipiell könnte der Transportmodus strikt von den äußeren Bedingungen abhängig sein.

In LacY haben  $\Delta pH$  und  $\Delta\phi$  denselben kinetischen Effekt auf den Zucker-Transport [162]. Eine pH-Erhöhung um den pKa-Wert sowie ein innen negatives Potential beschleunigen den Transport. Ähnliche Untersuchungen liegen für FucP [227], XylE [291] und GlcP [133] vor, mit qualitativ denselben Ergebnissen. Unter Bedingungen, bei denen pH-Gradient und Membranpotential vorliegen, erfolgt daher die Zucker-Translokation mit einer erhöhten Geschwindigkeit, weil der PMF-gekoppelte Symport-Modus beschleunigt wird. Verschiedene Autoren berechnen für LacY eine 1:1 Transport-Stöchiometrie von Proton und Zucker [292]. Auch für GlcP wurde eine äquimolare Stöchiometrie gefunden [133]. Diese Berechnungen basieren jedoch auf Messungen bei pH-Werten unterhalb der pK<sub>b</sub>-Werte und unter Einfluss eines Membranpotentials. Dies zeigt daher lediglich, dass der Symport unter diesen Bedingungen dominiert.

Um zu zeigen, dass ein Transporter kein Uniport katalysiert, also strikt gekoppelt funktioniert, muss unter alleinigem Einfluss eines Zuckergradienten gezeigt werden, dass im Zuge der Zuckertranslokation Potential und pH-Gradient aufgebaut werden. Solche aussagekräftige Experimente liegen jedoch nur für LacY vor [293]. Dies deutet auf eine strikere Kopplung zwischen Protonen- und Zuckertranslokation hin, die so in GlcP nicht vorhanden ist (siehe *oben*).

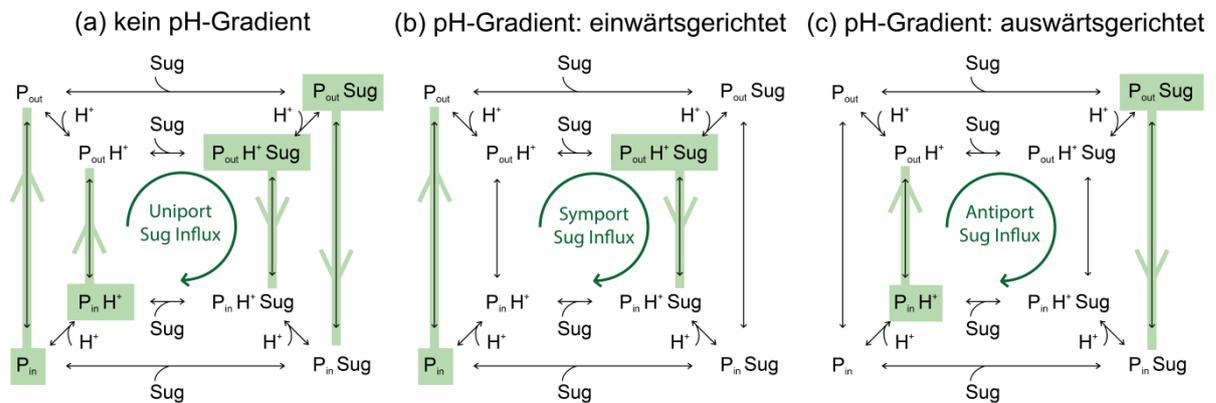
### **Die Substratgradienten beeinflussen den Transportmodus**

Es muss deutlich gemacht werden, dass ein idealer Symporter genauso wie ein idealer Antiporter nicht existieren. Das 8-Zustands-Modell (Seite 150, Abbildung 54) veranschaulicht, dass ein Symporter zu einem Antiporter werden kann, wenn die Substratgradienten entsprechend umgekehrt werden. Dies kann nur vollständig verhindert werden, wenn die Ratenkonstanten einzelner Konformationsänderungen null sind, was in der Realität unwahrscheinlich ist. Prinzipiell könnten daher alle Carrier dazu in der Lage sein sowohl Symport als auch Uniport und Antiport zu katalysieren. Unter gegebenen äußeren Bedingungen dominiert dann sehr wahrscheinlich ein

Transportmodus. Eine Betrachtung des 8-Zustands-Modells erklärt alle experimentellen Ergebnisse mit GlcP und zeigt gleichzeitig, weshalb GlcP *in vivo* und in den radioaktiven Experimenten, die in der Literatur beschrieben sind, als obligatorischer PMF-gekoppelter Symporter fungiert.

**Ohne Membranpotential katalysiert GlcP Uniport, Symport und Antiport**

Unter den im elektrophysiologischen Experiment vorliegenden Bedingungen (kein Membranpotential, einwärtsgerichteter Zuckergradient) ergibt sich im 8-Zustands-Modell für symmetrische pH-Werte ein einwärtsgerichteter Zucker-Uniport (*Abbildung 62a*). So akkumulieren aufgrund des Zuckergradienten die Zustände  $P_{out}S/P_{out}HS$  und  $P_{in}/P_{in}H$ . Dies erhöht die effektiven Raten der einwärtsgerichteten Konformationsänderung des Zucker-gebundenen und der auswärtsgerichteten Konformationsänderung des Zucker-freien Carriers. Je nach pH-Wert wird so der Uniport durch den protonierten ( $pH < pK_b$ ) oder den unprotonierten ( $pH > pK_b$ ) Carrier katalysiert, sodass entweder der innere oder der äußere Reaktionszyklus in *Abbildung 62a* aktiv ist. Die SSM-Messungen zeigen unter symmetrischen pH-Bedingungen keinen stationären elektrogenen Transport (*Seite 118, Abbildung 41*), weil der Uniport elektroneutral ist. Die *Exchange*-Messungen bei basischen pH-Werten  $> pK_b$  zeigen, dass eine Zuckertranslokation auch im unprotonierten Carrier stattfindet (*Seite 125, Abbildung 46*), was den Uniport-Modus im unprotonierten Carrier ermöglicht.



**Abbildung 62: Transportmodi im SSM-Experiment (kein Membranpotential, einwärtsgerichteter Zuckergradient).** Die Basis ist das 8-Zustands-Modell (*Seite 150, Abbildung 54*). Grün hinterlegt sind die Konformationen, die durch die entsprechenden Substrat-Gradienten im auswärtsgerichteten bzw. einwärtsgerichteten Zustand akkumulieren. Dadurch werden die effektiven Raten der entsprechenden Reaktionen (grüne Pfeile) erhöht und der Transportmodus definiert. In allen Fällen liegen kein Membranpotential und ein einwärtsgerichteter Zuckergradient an. (a) ohne pH-Gradient ergibt sich der Zucker-Influx im Uniport-Modus. Dies erklärt die Abwesenheit eines elektrogenen *steady-state* Signals auf der SSM (*Seite 118, Abbildung 41*). (b) Mit einwärtsgerichtetem pH-Gradienten ergibt sich der Zucker-Influx im Symport-Modus. Dies erklärt das *steady-state* Signal mit positivem Vorzeichen auf der SSM (*Seite 124, Abbildung 45*). (c) Mit auswärtsgerichtetem pH-Gradienten ergibt sich Zucker-Influx im Antiport-Modus, was das *steady-state* Signal mit negativem Vorzeichen erklärt (*Seite 124, Abbildung 45*).

Unter asymmetrischen pH-Bedingungen wird auf der SSM je nach Richtung des pH-Gradienten Symport ( $pH_o < pH_i$ ) oder Antiport ( $pH_o > pH_i$ ) detektiert (*Seite 124, Abbildung 45*). Ein einwärtsgerichteter pH-Gradient führt dazu, dass  $P_{out}HS$  und  $P_{in}$  akkumulieren, wodurch die Symport-

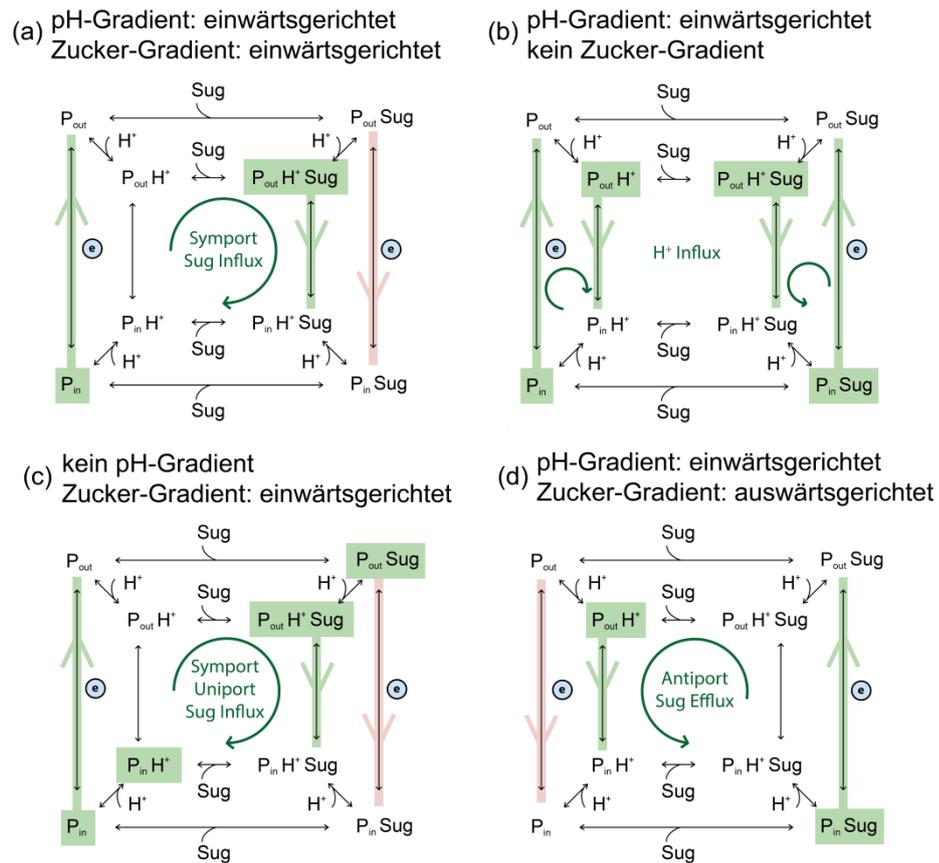
Reaktion angetrieben wird (*Abbildung 62b*). Ein auswärtsgerichteter pH-Gradient hingegen bewirkt die Akkumulierung von  $P_{out}S$  und  $P_{in}H$ , sodass der Antiport-Modus dominiert (*Abbildung 62c*).

### ***In vivo* katalysiert GlcP Symport**

Im Gegensatz zum SSM-Experiment liegt *in vivo* ein innen negatives Membranpotential an. Der pK-Wert der Zuckerbindung ist zwar mit 8,6 wesentlich niedriger als bei den *E.coli* Transportern, aber dennoch höher als der Umgebungs-pH-Wert von *Staphylococcus epidermidis*, der in leicht sauren Umgebungen wie der Haut und Schleimhaut von Säugern vorkommt [259]. Damit ist der auswärtsgerichtete Transporter protoniert. In der Regel ist die intrazelluläre D-Glucose-Konzentration sehr gering, da unmittelbar nach der Aufnahme die Phosphorylierung erfolgt. So ergibt sich ein einwärtsgerichteter Zuckergradient. Insgesamt können daher als Standardbedingungen *in vivo* ein innen negatives Potential sowie einwärtsgerichtete pH- und Zucker-Gradienten definiert werden.

Unter diesen Standardbedingungen akkumulieren  $P_{out}HS$  und  $P_{in}$ , was den Symport begünstigt (*Abbildung 63a*). Zugleich wird die im Symport-Modus vorkommende (und in den *E.coli* Transportern ratenlimitierende) Konformationsänderung von  $P_{in}$  nach  $P_{out}$  durch das Membranpotential beschleunigt und gleichzeitig die Konformationsänderung  $P_{out}S$  nach  $P_{in}S$ , also eine Reaktion im Antiport-Modus inhibiert. *In vivo* fungiert GlcP damit als Symporter. In der Literatur werden die Ergebnisse aus Transportassays präsentiert, die unter *in vivo* ähnlichen Bedingungen (innen negatives Membranpotential, einwärtsgerichteter pH-Gradient, einwärtsgerichteter Zuckergradient) durchgeführt wurden. Dies erklärt, dass GlcP als PMF-gekoppelter Symporter mit einer Substrat-Stöchiometrie von 1:1 identifiziert wurde [133].

Da der Zuckergradient den Transportmodus maßgeblich beeinflusst, muss sichergestellt sein, dass D-Glucose innerhalb der Zelle schnell in den Stoffwechsel eingeht. So treiben das Membranpotential sowie der pH-Gradient in Abwesenheit eines Zuckergradienten den einwärtsgerichteten Protonenfluss an (*Abbildung 63b*). Diese Reaktion könnte negative Auswirkungen für die bakterielle Energetik haben. Liegt ein auswärtsgerichteter Zucker-Gradient vor, so erfolgt der Zucker-Efflux im Antiport-Modus (*Abbildung 63d*). Auch wenn diese Szenarien *in vivo* aufgrund der Stoffwechselaktivitäten selten oder nie vorkommen, ist es wahrscheinlich, dass über definierte Ratenkonstanten der Konformationsänderungen diese Transportmodi verhindert werden. Mögliche asymmetrische pK-Werte, wie sie für die *E.coli* Transporter gefunden wurden, könnten ebenfalls dazu beitragen, dass nur der gewünschte Transportmodus, also der einwärtsgerichtete Symport, stattfindet.



**Abbildung 63: Mögliche Transportmodi *in vivo* (innen negatives Membranpotential).** Die Basis ist das 8-Zustands-Modell (Seite 150, Abbildung 54). Die Substrat-Gradienten führen zur Akkumulierung der grün hinterlegten Konformationen, was die nachfolgenden Konformationsänderungen antreibt (grüne Pfeile). Zusätzlich liegt *in vivo* ein innen negatives Membranpotential an, das die Ratenkonstanten der elektrogenen Konformationsänderungen (gekennzeichnet mit dem Symbol der Elementarladung „e“) beeinflusst: Die negative Ladung der Protonenbindestelle wird schneller nach außen (grüner Pfeil), aber langsamer nach innen (roter Pfeil) transferiert. In allen Fällen liegt ein innen negatives Membranpotential vor. (a) Standardbedingungen *in vivo* sind einwärtsgerichtete pH- und Zucker-Gradienten, die zusammen mit dem Membranpotential den Zucker-Influx im Symport-Modus antreiben und gleichzeitig den Antiportmodus inhibieren. (b) Im Extremfall liegt *in vivo* kein Zuckergradient vor. In diesem Fall ergibt sich durch das Membranpotential und den pH-Gradienten ein Protonen-Influx. (c) Das Fehlen eines pH-Gradienten ist *in vivo* sehr unwahrscheinlich, würde aber lediglich zu einer Verlangsamung des Symport-Modus führen. Möglicherweise findet bei basischen pH-Werten ein Teil des Transports im Uniport-Modus statt. (d) Das größte Problem *in vivo* ergibt sich bei einem auswärtsgerichteten Zucker-Gradienten. In diesem Fall würde sich ein Zucker-Efflux im Antiport-Modus ergeben. Ein auswärtsgerichteter Zuckergradient muss in jedem Fall vermieden werden. Es ist anzumerken, dass sich dies nur dann ergibt, wenn alle Reaktionen mit denselben Ratenkonstanten und als schnelle Gleichgewichte betrachtet werden. Tatsächlich könnten die Ratenkonstanten der einzelnen Reaktionen unterschiedlich sein, sodass kein signifikanter Zucker-Efflux stattfinden würde.

Der Transportmodus *in vivo* ist aufgrund des Membranpotentials weniger abhängig vom pH-Gradienten als der Transportmodus im SSM-Experiment. In Abwesenheit eines pH-Gradienten (Abbildung 63c) wird *in vivo* weiterhin Zucker importiert. Bei sauren pH-Werten erfolgt der Zucker-Influx im Symport-Modus, während bei basischen pH-Werten möglicherweise ein Teil des Transports im Uniport-Modus stattfinden könnte. Insgesamt sorgt das innen negative Membranpotential sehr wahrscheinlich dafür, dass die Netto-Transportrate *in vivo* gegenüber der im SSM-Experiment erheblich erhöht ist. Dies sollte vor allem dann der Fall sein, wenn die Ratenlimitierung für den Uniport-Modus bei  $pH > pK_b$  durch die Konformationsänderung des leeren Carriers gegeben ist, wie im Symport-Modus der *E.coli* Transporter.

## Flusskopplung auf der Ebene der Konformationsänderungen

Im vorangegangenen Abschnitt wurde qualitativ diskutiert wie die Substratgradienten den Transportmodus im 8-Zustands-Modell beeinflussen könnten. Erste Simulationen im 8-Zustands-Modell zeigten, dass ein geringes Maß Flusskopplung auf der Ebene der Konformationsänderungen erforderlich ist, um die experimentellen Ergebnisse zu simulieren (*Daten nicht gezeigt*).

Die durchgeführten Simulationen basieren auf dem 8-Zustands-Modell. Auf Basis der Ergebnisse für GlcP wird ein symmetrischer pK-Wert von 8,6 angenommen (*Seite 118, Abbildung 41*). Alle Bindungsreaktionen sind schnelle Gleichgewichte, während den vier Konformationsänderungen feste, symmetrische Ratenkonstanten zugewiesen werden. Die *Detailed Balance* ist damit automatisch berücksichtigt. Es sind ausschließlich die Konformationsänderungen in PS und P elektrogen und transferieren eine Elementarladung. Ziel der Simulation war es die drei folgenden experimentellen Ergebnisse zu simulieren. Erstens erfolgt ohne pH-Gradient keine Protonentranslokation (*Seite 118, Abbildung 41*). Zweitens resultiert bei einwärtsgerichtetem Zuckergradienten eine Protonentranslokation, die von der Richtung des pH-Gradienten abhängig ist (*Seite 124, Abbildung 45*). Und drittens beschleunigt im radioaktiven Transportassay die Anwesenheit von  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  den Zucker-Transport [133].

Diese Ergebnisse werden durch die Simulation nur dann erhalten, wenn die Ratenkonstanten der einzelnen Konformationsänderungen bestimmte Werte annehmen. So wurde auf Basis der Ratenkonstante der *pre steady-state* Reaktion in GlcP die Konformationsänderung in PS auf  $200 \text{ s}^{-1}$  festgesetzt (*Seite 107, Tabelle 20*). Die Konformationsänderung in PHS wurde ähnlich wie in den Simulationen des 6-Zustands-Modells (*Seite 62, Tabelle 10*) mit  $200 \text{ s}^{-1}$  auf denselben Wert festgelegt. Die Konformationsänderungen im unprotonierten Carrier müssen signifikant langsamer erfolgen, um die oben genannten experimentellen Ergebnisse in der Simulation zu reproduzieren. So wurde die Ratenkonstante des leeren Carriers auf  $10 \text{ s}^{-1}$  und die des protonierten Carriers auf  $5 \text{ s}^{-1}$  festgesetzt. Die experimentellen Ergebnisse haben gezeigt, dass die Ratenkonstanten jeder der vier Konformationsänderungen in GlcP endlich sein muss. Die Simulationen zeigen darüber hinaus, dass sie nicht gleich schnell sein dürfen. Unterschiedliche Ratenkonstanten der Konformationsänderungen sind gleichbedeutend mit einem geringen Maß Flusskopplung.

Die *E.coli* Transporter zeigen ein signifikant höheres Maß an Flusskopplung auf der Ebene der Konformationsänderungen. Die fehlende Vorzeichenumkehr der *pre steady-state* Signale bei  $\text{pH} > \text{pKb}$  impliziert, dass die Ratenkonstante der Konformationsänderung in PS für die *E.coli* Transporter nahe null ist (*Seite 106, Abbildung 36*). Sehr wahrscheinlich hat die Konformationsänderung in PS eine sehr hohe Aktivierungsenergie. Der Übergang könnte als verboten

betrachtet werden, was einer strikten Kopplung gleich kommt. LacY, FucP und XyleE zeigen im Experiment die Eigenschaften eines strikten Symporters.

GlcP, der Symporter XyleE und der Uniporter GLUT1 zeigen einen hohen Grad evolutionärer Verwandtschaft. Die Verwandtschaft zwischen XyleE und GLUT1 lässt sich leicht nachvollziehen. Unter Anwesenheit eines Zuckergradienten im Darm wurde der PMF-gekoppelte Symport Modus nicht mehr benötigt, sodass die Protonenbindestelle in GLUT1 im Laufe der Evolution verloren gegangen ist. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass GlcP abhängig von den äußeren Bedingungen Symport, Uniport und Antiport katalysiert. GlcP könnte eine Zwischenstufe während der Evolution vom Symporter zum Uniporter darstellen. Das chemiosmotische Potential stellt neben dem Zuckergradienten eine zusätzliche Triebkraft für den Zuckertransport dar. Die Kopplung zwischen Protonen- und Zuckertranslokation ist jedoch erheblich reduziert, sodass der Transportmodus sehr von den äußeren Bedingungen abhängig ist.

### **Flusskopplung auf der Ebene der Substratbindung**

Die Experimente zeigen, dass sich Zuckerbindung und Protonenbindung gegenseitig beeinflussen. In den *E.coli* Transportern steigt die Affinität zum Zucker bei saurem pH-Wert ([Seite 82, Tabelle 14](#)). Die Protonenbindung begünstigt damit die Zuckerbindung. In GlcP hingegen verhält es sich genau umgekehrt ([Seite 120, Abbildung 43](#)), was möglicherweise den Antiport fördern könnte. Auf Basis der 3D-Strukturen kann ein molekularer Mechanismus für die positive Kooperativität in den *E.coli* Transportern beschrieben werden, der kompatibel mit dem pK-switch Mechanismus ist ([Seite 188, Abbildung 61](#)). Der Mechanismus soll an dieser Stelle für LacY beschrieben werden. Im Anhang auf [Seite A21f](#) befindet sich eine Übertragung des Mechanismus auf FucP und XyleE.

Es ist publiziert, dass LacY protoniert sein muss, um Zucker mit hoher Affinität zu binden [[125, 136, 294](#)]. So sinkt die Affinität zum Zucker bei basischen pH-Werten mit einem pK-Wert von 10,5. Es wurde darüber hinaus gezeigt, dass die *on*-Rate der Zuckerbindung pH-unabhängig ist, während die *off*-Rate mit steigendem pH-Wert zunimmt [[164, 176, 177](#)]. Der Zucker ist damit zwar in der Lage vor dem Proton zu binden (*k<sub>f</sub>* ist pH-unabhängig). Aber der Zucker-gebundene Zustand wird erst durch die Protonenbindung stabilisiert (*k<sub>r</sub>* ist reduziert). Es wird also ein Proteinsegment benötigt, das infolge der Protonierung den Zucker innerhalb der Bindetasche festhält. Die Strukturen zeigen, dass die Protonenbindestelle E325 jedoch zu weit entfernt von der Zuckerbindetasche liegt, um direkte Wechselwirkungen mit dem Zucker [[135](#)] oder anderen funktional wichtigen Resten einzugehen [[130, 138, 139](#)]. Eine Mutation der Protonenbindestelle E325 verhindert zwar den Einfluss des pH-Wertes auf die Zuckerbindung, hat aber keinen Einfluss auf die Zuckeraffinität im physiologischen pH-Bereich [[177](#)]. E325 ist daher nicht selbst für diesen Flusskopplungsmechanismus verantwortlich.

Tatsächlich zeigen verschiedene Experimente, dass eine einzelne Aminosäure für den Kopplungsmechanismus eine zentrale Rolle spielt. Der pK-Wert von 10,5 für die Zuckerbindung konnte der Triade aus H322, E269 und Y236 zugeordnet werden [295]. Die Phänotypen der H322X-Mutanten bestätigen die Bedeutung von H322 für die Flusskopplung. Wenn H322 durch Arginin substituiert wird, katalysiert LacY keinen Potential-getriebenen aktiven Lactose-Transport mehr. Die Fähigkeit zum Lactose-Uniport entlang eines hohen Konzentrationsgradienten bleibt jedoch erhalten [243, 296]. H322 ist demnach für die Kopplung der Zuckertranslokation an die Protonentranslokation essentiell. Mutationen in H322 reduzieren sowohl die Zuckeraffinität als auch die pH-Abhängigkeit der Zuckerbindung gegenüber der des wt signifikant [177]. H322 ist damit sowohl in Protonierung als auch in die Zuckerbindung involviert.

Strukturelle Vergleiche zwischen der Substrat-freien (2CFQ) und der Substrat-gebundenen (4OAA) Konformation in LacY sind der Schlüssel für das Verständnis des H322-vermittelten Kopplungsmechanismus. Im Zucker-freien Zustand geht H322- $\delta$ N eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Hydroxylgruppe von Y236 ein, während H322- $\epsilon$ NH frei ist (Seite 188, Abbildung 61, Zustand 1). Im Zucker-gebundenen Zustand ist H322- $\epsilon$ NH Wasserstoffbrückendonator für die C3OH-Gruppe des Galaktopyranosid-Liganden [135]. Diese Wechselwirkung benötigt allerdings eine Rotation des Imidazol-Rings um etwa 30°, wodurch H322- $\delta$ N nicht mehr mit Y236-OH interagieren kann, sondern Kontakt mit E325 aufnimmt (Seite 188, Abbildung 61, Zustand 8). Dieser Kontakt ist jedoch nur stabil, wenn der Transporter im protonierten Zustand vorliegt. So stabilisiert die Protonenbindung den Zucker-gebundenen Zustand. Die Bedeutung des freien Elektronenpaares am Stickstoff in H322 zeigen auch Histidin-Labeling-Experimente mit Diethylpyrocarbonat [297].

## Inhibition von XylE durch D-Glucose

Es konnte gezeigt werden, dass D-Glucose an wt XylE bindet und den Transport von D-Xylose inhibiert, aber nicht selbst transportiert wird [132, 144] (Seite 127, Tabelle 23). Im SSM-Experiment induziert D-Glucose jedoch ein biphasisches Signal (Seite 129, Abbildung 47). Es wird sowohl der schnelle *induced fit* als auch eine folgende langsame elektrogene Reaktion detektiert. Messungen mit verschiedenen LPRs bestätigen, dass es sich bei der langsamen Signalkomponente um eine *pre steady-state* Ladungsverschiebung handeln muss (Seite 78, Abbildung 25).

## Wt und Q175I/L297F XylE zeigen zwei elektrogene Reaktionen

Ein Vergleich der D-Glucose-induzierten Signale an wt XylE (Seite 129, Abbildung 47), D27N XylE (Seite 130, Abbildung 48) und Q175I/L297F XylE (Seite 132, Abbildung 49) hilft dabei die Reaktion zwischen D-Glucose und XylE besser zu verstehen. Sowohl wt XylE als auch Q175I/L297F XylE zeigen

D-Glucose-induzierte, langsame transiente Ströme. In wt Xyle wurde dieser transiente Strom aufgrund radioaktiver Transportassays [132, 144] und SSM-Messungen mit verschiedenen LPRs (Seite 78, Abbildung 25) als *pre steady-state* identifiziert. Für Q175I/L297F Xyle wurde im radioaktiven Transportassay dagegen gezeigt, dass D-Glucose transportiert wird [144]. Da im SSM-Experiment lediglich Ströme, nicht aber direkt die Zuckertranslokation beobachtet wird, bleibt zunächst nur die Annahme, dass der D-Glucose-induzierte, langsame transiente Strom in Q175I/L297F Xyle ein *steady-state* Signal repräsentiert. Diese Annahme ist mit drei Beobachtungen kompatibel.

Das Bindungsmodell zeigt, dass eine höhere Affinität automatisch mit einer niedrigeren Umsatzrate einhergeht, wenn die der Bindung folgende Konformationsänderung des beladenen Carriers ratenlimitierend ist (Seite 171, Abbildung 56, blaue Kurve). Tatsächlich ist der KM-Wert für D-Glucose in Q175I/L297F Xyle erhöht gegenüber dem in wt Xyle (Seite 131, Tabelle 24). So könnte eine hohe Affinität zu D-Glucose in wt Xyle dafür verantwortlich sein, dass der *steady-state* Transport reduziert ist. Im Gegensatz dazu führt die niedrigere Affinität in Q175I/L297F Xyle dazu, dass eine endliche Transportrate detektiert werden kann. Interessanterweise ist auch die im *induced fit* von D-Glucose transferierte Ladung in Q175I/L297F Xyle (Seite 132, Abbildung 49) signifikant größer als in wt Xyle (Seite 129, Abbildung 47). Die transferierte Ladung nähert sich der durch den *induced fit* von D-Xylose in wt Xyle transferierte Ladung an (Seite 106, Abbildung 36c). Dies deutet darauf hin, dass der Transporter-Zustand der Q175I/L297F Mutante mit gebundener D-Glucose ähnlich ist zu dem Transporter-Zustand des wt mit gebundener D-Xylose. Damit könnten die Energieniveaus der Substrat-gebundenen Transporter-Zustände so beeinflusst sein, dass *steady-state* Transport ermöglicht wird (Seite 171, Abbildung 56, grüne Kurve). Zuletzt zeigt die pH-Abhängigkeit des D-Glucose-Transports in Q175I/L297F Xyle im Gegensatz zu der in wt Xyle zwei pK<sub>b</sub>-Werte (Seite 131, Tabelle 24). Der zweite pK<sub>b</sub>-Wert wird auch im pH-Profil für den D-Xylose Transport in wt Xyle beobachtet, sodass er sehr wahrscheinlich charakteristisch für *steady-state* Transport ist.

### Ein kinetisches Modell für die Reaktion von D-Glucose mit wt Xyle

Welche elektrogene Reaktion ist für das langsame D-Glucose-induzierte Signal in wt Xyle verantwortlich? Da die Inhibition des Signals im sauren pH-Bereich mit demselben pK<sub>a</sub>-Wert erfolgt wie die Inhibition des Xylose-Transports (Seite 131, Tabelle 24), muss die elektrogene *pre steady-state* Reaktion der D-Glucose wie auch die im *steady-state* dominierende elektrogene Reaktion der D-Xylose nach der Protonenfreisetzung erfolgen. Es liegt nahe anzunehmen, dass es sich in beiden Fällen um dieselbe Reaktion handelt, nämlich den Transfer der negativ geladenen Protonenbindestelle über die Membran (Seite 165, Abbildung 55). Dies ist auch mit der Beobachtung kompatibel, dass D-Glucose-induziert genau eine Elementarladung ( $30 \pm 8$  pC) über die Membran

transferiert wird. Als eine Elementarladung pro Transporter auf der SSM wurden  $25 \pm 4$  pC identifiziert, wie auf [Seite 158](#) beschrieben.

Im MKM wird die elektrogene Reaktion des *steady-states* durch die Konformationsänderung des leeren Carriers bestimmt ([Seite 61, Abbildung 18](#)). Der durch D-Glucose induzierte Reaktionszyklus könnte dann wie folgt ablaufen. D-Glucose bindet an den protonierten Carrier und induziert die Konformationsänderung, wobei auf der anderen Seite der Membran das Proton freigesetzt wird, aber D-Glucose an den Transporter gebunden bleibt. Im Anschluss erfolgt die Konformationsänderung des unprotonierten Carriers, welche dann die negativ geladene Protonenbindestelle nach außen transferiert und für die detektierte Ladungsverschiebung verantwortlich ist. D-Glucose bleibt jedoch weiterhin an den Transporter gebunden, der sich nach der Konformationsänderung in einem semiokkludierten Zustand befinden muss. Ausgehend von diesem Zustand kann keine erneute Protonenbindung stattfinden, da dies zu einer *steady-state* Protonentranslokation führen würde. Möglicherweise verhindert der gebundene Zucker die Reptonierung. Für die *E.coli* Transporter wird angenommen, dass nach der Zuckerbindung keine Protonierung erfolgen kann, weil die Protonenbindestelle nicht mehr zugänglich ist [\[135\]](#). Dieses Modell nimmt eine sehr niedrige *off*-Rate für die D-Glucose-Bindung an, die es experimentell zu überprüfen gilt.

## Überlegungen zur Flusskopplung

Die D-Glucose-induzierten Peakströme in Q175I/L297F XylE sind kleiner als die in wt XylE, obwohl Q175I/L297F XylE *steady-state* Transport katalysiert, der wt jedoch nicht. Im Vergleich zu wt XylE ist in Q175I/L297F XylE die Amplitude des D-Glucose-induzierten Signals nur etwa halb so groß ([Seite 127, Tabelle 23](#)). Der Unterschied zwischen wt und Q175I/L297F XylE liegt in der Kopplung zwischen Protonen- und Glucose-Translokation, genauer gesagt in der Kopplung zwischen der Protonenfreisetzung und der Zuckerfreisetzung. Während im wt die elektrogene Reaktion zwar schneller erfolgt, aber nur als *pre steady-state* Reaktion detektiert wird, ermöglicht die Kopplung der Glucose-Translokation an die Protonenfreisetzung in Q175I/L297F XylE einen stationären Transport auf Kosten der Geschwindigkeit der elektrogenen Reaktion.

Im Allgemeinen kann die Kopplung der Substrattranslokation in einem Symporter dadurch gewährleistet werden, dass Flusskopplungsmechanismen die Bindung beider Substrate sicherstellt. Entsprechende Mechanismen konnten für die *E.coli* Transporter im Rahmen dieser Arbeit formuliert werden: Die Bindung von Proton und Zucker sind gekoppelt, was sich durch niedrigere KM-Werte bei sauren pH-Werten bemerkbar macht ([Seite 82, Tabelle 14](#)). Zudem findet die Konformationsänderung nur dann statt, wenn das Proton gebunden hat, was sich durch das fehlende

*pre steady-state* Signal mit negativem Vorzeichen bei  $\text{pH} > \text{pK}_b$  bemerkbar macht (Seite 106, Abbildung 36). Die fehlende Kopplung zwischen der Glucose-Translokation und der Protonen-Freisetzung in wt XylE zeigt, dass zumindest in diesem Fall Kopplungsmechanismen ausgehebelt sind, die bei der Freisetzung der Substrate eine Rolle spielen. So erfolgen D-Glucose-induziert die Protonenfreisetzung und die elektrogene Konformationsänderung, aber nicht die Zuckerfreisetzung.

Interessanterweise ist XylE aus *Pantoea ananatis* (33,7% Identität, 53,1 % Ähnlichkeit im *pairwise alignment* mit XylE aus *E.coli*) dazu in der Lage sowohl den Transport von D-Xylose als auch den von D-Glucose zu katalysieren [298]. Die zu Q175 und L297 in *E.coli* XylE homologen Aminosäuren sind in *P.ananatis* XylE Q152 und Q282, also keinesfalls ähnlich zu den homologen Aminosäuren in GLUT1 (I168 und F291). Einzelne Aminosäuren sind damit nicht der Schlüssel für den Kopplungsmechanismus. Vielmehr haben die entsprechenden Mutationen sehr wahrscheinlich Einfluss auf die Konformation des Transporters, wie auch eine Betrachtung der Interaktionsnetzwerke der 3D-Strukturen von wt XylE mit gebundener D-Glucose zeigt (Seite A10, Abbildung 65). So deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Q175 und L297 die Transporter-Konformation mit gebundener D-Glucose massiv beeinflussen. Zugleich induziert D-Glucose eine rigidere Struktur mit mehr intramolekularen Interaktionen, sodass der Transporter in einem Energieminimum gefangen sein könnte (Seite 171, Abbildung 56). Die Mutationen könnten diese Interaktionen verhindern und damit den Transport ermöglichen.

---

 VERZEICHNISSE
 

---

## Literaturverzeichnis

1. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008) *Molecular Biology of the Cell*, 5. ed. Garland Science, NY.
2. Guidotti G. (1972) Membrane proteins. *Annual Review of Biochemistry* 41: 731–752
3. Vance D. E., Vance J. E. (2008) *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, 5th ed. Elsevier, Amsterdam, London
4. Fahy E., Subramaniam S., Brown H. A., Glass C. K., Merrill A. H., Murphy R. C., Raetz C. R. H., Russell D. W., Seyama Y., Shaw W., Shimizu T., Spener F., van Meer G., VanNieuwenhze M. S., White S. H., Witztum J. L., Dennis E. A. (2005) A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research* 46(5): 839–861
5. Tanford C. (1979) *The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes*. John Wiley, New York
6. Chandler D. (2005) Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. *Nature* 437(7059): 640–647
7. Gorter E., Grendel F. (1925) On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *The Journal of Experimental Medicine* 41(4): 439–443
8. Milhaud J. (2004) New insights into water-phospholipid model membrane interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1663(1-2): 19–51
9. Adam G., Lauger P., Stark G. (2009) *Physikalische Chemie und Biophysik*, 5., uberarb. Aufl. Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin, Heidelberg
10. Chen L. (2004) *Microwave electronics: Measurement and materials characterisation*. John Wiley, Chichester
11. Hippel A. R. von (1995) *Dielectrics and waves*. Artech House, Boston, London
12. Zhou F., Schulten K. (1995) Molecular Dynamics Study of a Membrane-Water Interface. *The Journal of Physical Chemistry* 99(7): 2194–2207
13. Walz D, Teissie J, Milazzo G (eds) (2004) *Bioelectrochemistry of Membranes*. Birkhuser Basel, Basel
14. Cherepanov D. A, Feniouk B. A, Junge W., Mulkidjanian A. Y (2003) Low dielectric permittivity of water at the membrane interface: effect on the energy coupling mechanism in biological membranes. *Biophysical Journal* 85(2): 1307–1316
15. Marsh D. (2001) Polarity and permeation profiles in lipid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(14): 7777–7782
16. Marsh D. (2002) Membrane water-penetration profiles from spin labels. *European Biophysics Journal (EBJ)* 31(7): 559–562
17. Krein P. T (1998) *Elements of power electronics. The Oxford series in electrical and computer engineering*. Oxford University Press, New York
18. Sangwine S. (2007) *Electronic components and technology*, 3rd ed. Tutorial guides in electronic engineering. CRC Press, Boca Raton
19. Bowick C. (2008) *RF circuit design*. Newnes, Amsterdam, London
20. O’Shea P. (2004) *Membrane potentials: measurement, occurrence and roles in cellular functions*. In: Walz D, Teissie J, Milazzo G (eds) *Bioelectrochemistry of Membranes*. Birkhuser Basel, Basel, pp 23–59
21. McLaughlin S. (1989) The electrostatic properties of membranes. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* 18: 113–136
22. Cevc G., Marsh D. (1987) *Phospholipid bilayers: Physical principles and models*. John Wiley, New York
23. Cevc G. (1990) Membrane electrostatics. *Biochimica et Biophysica Acta* 1031(3): 311–382
24. Stavroulakis P. (2003) *Biological effects of electromagnetic fields: Mechanisms, modeling, biological effects, therapeutic effects, international standards, exposure criteria*. Springer, Berlin, New York

25. Mulikidjanian A. Y, Heberle J., Cherepanov D. A (2006) Protons @ interfaces: implications for biological energy conversion. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757(8): 913–930
26. Grahame D. C (1947) The Electrical Double Layer and the Theory of Electrocapillarity. *Chemical Reviews* 41(3): 441–501
27. Stern O. (1924) Zur Theorie der elektrolytischen Doppelschicht (The theory of the electrolytic double-layer). *Zeitschrift für Elektrochemie und Angewandte Physikalische Chemie*(30): 508–516
28. Helmholtz H. L (1879) Studien über electrische Grenzsichten. *Wiedemann's Annalen der Physik und Chemie*(7): 337–382
29. Chapman D. L (1913) A contribution to the theory of electrocapillarity. *Philosophical Magazine Series 6* 25(148): 475–481
30. Gouy M. (1910) Sur la constitution de la charge électrique à la surface d'un électrolyte. *Journal de Physique Théorique et Appliquée* 9(1): 457–468
31. Müller R. H, Nitzsche R., Paulke B.-R. (1996) Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis: Einführung in die Theorie, praktische Messdurchführung, Dateninterpretation. Wiss. Verl.-Ges, Stuttgart
32. Brockman H. (1994) Dipole potential of lipid membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* 73(1-2): 57–79
33. Flewelling R. F, Hubbell W. L (1986) The membrane dipole potential in a total membrane potential model. Applications to hydrophobic ion interactions with membranes. *Biophysical Journal* 49(2): 541–552
34. Franklin J. C, Cafiso D. S (1993) Internal electrostatic potentials in bilayers: measuring and controlling dipole potentials in lipid vesicles. *Biophysical Journal* 65(1): 289–299
35. Gawrisch K., Ruston D., Zimmerberg J., Parsegian V. A, Rand R. P, Fuller N. (1992) Membrane dipole potentials, hydration forces, and the ordering of water at membrane surfaces. *Biophysical Journal* 61(5): 1213–1223
36. Schamberger J., Clarke R. J (2002) Hydrophobic ion hydration and the magnitude of the dipole potential. *Biophysical Journal* 82(6): 3081–3088
37. Schoch P., Sargent D. F, Schwyzer R. (1979) Capacitance and conductance as tools for the measurement of asymmetric surface potentials and energy barriers of lipid bilayer membranes. *The Journal of Membrane Biology* 46(1): 71–89
38. Nernst W. H (1989) Die elektromotorische Wirksamkeit der Ionen. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 4(3): 129–181
39. Nernst W. H (1888) Zur Kinetik der in Lösung befindlichen Körper. Erste Abhandlung. Theorie der Diffusion. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 2(9): 613–637
40. Goldman D. E (1943) Potential, impedance, and rectification in membranes. *The Journal of General Physiology* 27(1): 37–60
41. Hodgkin A. L, Katz B. (1949) The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid. *The Journal of Physiology* 108(1): 37–77
42. Parsegian A. (1969) Energy of an ion crossing a low dielectric membrane: solutions to four relevant electrostatic problems. *Nature* 221(5183): 844–846
43. Born M. (1920) Volumen und Hydratationswärme der Ionen. *Zeitschrift für Physik* 1(1): 45–48
44. Boström M., Ninham B. W (2005) Energy of an ion crossing a low dielectric membrane: the role of dispersion self-free energy. *Biophysical Chemistry* 114(2-3): 95–101
45. Neumcke B., Läger P. (1969) Nonlinear electrical effects in lipid bilayer membranes. II. Integration of the generalized Nernst-Planck equations. *Biophysical Journal* 9(9): 1160–1170
46. Fick A. (1855) Über Diffusion. *Annalen der Physik und Chemie* 170(1): 59–86
47. Planck M. (1890) Über die Erregung von Electricität und Wärme in Electrolyten. *Annalen der Physik und Chemie* 275(2): 161–186
48. Planck M. (1890) Über die Potentialdifferenz zwischen zwei verdünnten Lösungen binärer Electrolyte. *Annalen der Physik und Chemie* 276(8): 561–576
49. Orbach E., Finkelstein A. (1980) The nonelectrolyte permeability of planar lipid bilayer membranes. *The Journal of General Physiology* 75(4): 427–436
50. Walter A., Gutknecht J. (1986) Permeability of small nonelectrolytes through lipid bilayer membranes. *The Journal of Membrane Biology* 90(3): 207–217
51. Paula S., Volkov A. G, van Hoek A. N, Haines T. H, Deamer D. W (1996) Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness. *Biophysical Journal* 70(1): 339–348
52. Overton E. (1901) Studien über die Narkose, zugleich ein Beitrag zur allgemeinen Pharmakologie. Gustav Fischer, Jena
53. Meyer H. (1899) Zur Theorie der Alkoholnarkose. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 42(2-4): 109–118
54. Missner A., Pohl P. (2009) 110 years of the Meyer-Overton rule: predicting membrane permeability of gases and other small compounds. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* 10(9-10): 1405–1414
55. Al-Awqati Q. (1999) One hundred years of membrane permeability: does Overton still rule? *Nature Cell Biology* 1(8): E201-2
56. Biegel C. M, Gould J. M (1981) Kinetics of hydrogen ion diffusion across phospholipid vesicle membranes. *Biochemistry* 20(12): 3474–3479
57. Deamer D. W, Bramhall J. (1986) Permeability of lipid bilayers to water and ionic solutes. *Chemistry and Physics of Lipids* 40(2-4): 167–188
58. Deamer D. W, Nichols J. W (1989) Proton flux mechanisms in model and biological membranes. *The Journal of Membrane Biology* 107(2): 91–103
59. Cukierman S. (2006) Et tu, Grotthuss! and other unfinished stories. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757(8): 876–885

60. Grotthuss T. v, Luther R., Oettingen A. Jv (1906) Abhandlungen über Elektrizität und Licht (1806-1820). Ostwald's Klassiker der exakten Wissenschaften, Nr. 152. Engelmann, Leipzig
61. Gurtovenko A. A, Vattulainen I. (2007) Ion leakage through transient water pores in protein-free lipid membranes driven by transmembrane ionic charge imbalance. *Biophysical Journal* 92(6): 1878–1890
62. Díaz R. S, Monreal J. (1994) Unusual Low Proton Permeability of Liposomes Prepared from the Endogenous Myelin Lipids. *Journal of Neurochemistry* 62(5): 2022–2029
63. Hediger M. A, Cléménçon B., Burrier R. E, Bruford E. A (2013) The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. *Molecular Aspects of Medicine* 34(2-3): 95–107
64. Bröer S., Wagner C. A (2003) Membrane transporter diseases. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York
65. Voet D., Voet J. G (2011) Biochemistry, 4th ed. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ
66. Feng L., Campbell E. B, MacKinnon R. (2012) Molecular mechanism of proton transport in CLC Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> exchange transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(29): 11699–11704
67. Jardetzky O. (1966) Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature* 211(5052): 969–970
68. Eicher T., Seeger M. A, Anselmi C., Zhou W., Brandstätter L., Verrey F., Diederichs K., Faraldo-Gómez J. D, Pos K. M (2014) Coupling of remote alternating-access transport mechanisms for protons and substrates in the multidrug efflux pump AcrB. *eLife* 3
69. Kazmier K., Sharma S., Quick M., Islam S. M, Roux B., Weinstein H., Javitch J. A, McHaourab H. S (2014) Conformational dynamics of ligand-dependent alternating access in LeuT. *Nature Structural & Molecular Biology* 21(5): 472–479
70. van Wonderen J. H, McMahan R. M, O'Mara M. L, McDevitt C. A, Thomson A. J, Kerr I. D, MacMillan F., Callaghan R. (2014) The central cavity of ABCB1 undergoes alternating access during ATP hydrolysis. *The FEBS journal* 281(9): 2190–2201
71. Stark G., Ketterer B., Benz R., Läuger P. (1971) The rate constants of valinomycin-mediated ion transport through thin lipid membranes. *Biophysical Journal* 11(12): 981–994
72. Neumcke B. (1975) The action of uncouplers on lipid bilayer membranes. *Membranes* 3: 215–253
73. Viitanen P., Garcia M. L, Kaback H. R (1984) Purified reconstituted lac carrier protein from *Escherichia coli* is fully functional. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81(6): 1629–1633
74. Katzir-Katchalsky A., Curran P. F (1965) Nonequilibrium thermodynamics in biophysics. Harvard books in biophysics. Harvard University Press, Cambridge
75. Tosteson D. C (1989) Membrane transport. People and ideas, 1989: 1. American Physiological Society, Bethesda, Md
76. Doki S., Kato H. E, Solcan N., Iwaki M., Koyama M., Hattori M., Iwase N., Tsukazaki T., Sugita Y., Kandori H., Newstead S., Ishitani R., Nureki O. (2013) Structural basis for dynamic mechanism of proton-coupled symport by the peptide transporter POT. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(28): 11343–11348
77. Schuldiner S. (2014) Competition as a way of life for H<sup>(+)</sup>-coupled antiporters. *Journal of Molecular Biology* 426(14): 2539–2546
78. Călinescu O., Paulino C., Kühlbrandt W., Fendler K. (2014) Keeping it simple, transport mechanism and pH regulation in Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. *The Journal of Biological Chemistry* 289(19): 13168–13176
79. Zhang X. C, Zhao Y., Heng J., Jiang D. (2015) Energy coupling mechanisms of MFS transporters. *Protein Science: a Publication of the Protein Society* 24(10): 1560–1579
80. Carrasco N., Püttner I. B, Antes L. M, Lee J. A, Larigan J. D, Lolkema J. S, Roepe P. D, Kaback H. R (1989) Characterization of site-directed mutants in the lac permease of *Escherichia coli*. 2. Glutamate-325 replacements. *Biochemistry* 28(6): 2533–2539
81. Morrison E. A, Robinson A. E, Liu Y., Henzler-Wildman K. A (2015) Asymmetric protonation of EmrE. *The Journal of General Physiology* 146(6): 445–461
82. Gayen A., Leninger M., Traaseth N. J (2016) Protonation of a glutamate residue modulates the dynamics of the drug transporter EmrE. *Nature chemical biology* 12(3): 141–145
83. Mitchell P. (1966) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 41(3): 445–502
84. Mitchell P. (1961) Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature* 191(4784): 144–148
85. Booth I. R (1985) Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological reviews* 49(4): 359–378
86. Hummel C. S, Lu C., Loo D. DF, Hirayama B. A, Voss A. A, Wright E. M (2011) Glucose transport by human renal Na<sup>+</sup>/D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2. *American Journal of Physiology, Cell Physiology* 300(1): C14-21
87. Longpré J.-P., Lapointe J.-Y. (2011) Determination of the Na<sup>(+)</sup>/glucose cotransporter (SGLT1) turnover rate using the ion-trap technique. *Biophysical Journal* 100(1): 52–59
88. Bentaboulet M., Kepes A. (1981) Dependence on pH of parameters of lactose transport in *Escherichia coli*. Evidence for an essential protonated group of the carrier. *European Journal of Biochemistry (FEBS)* 117(2): 233–238
89. Viitanen P., Garcia M. L, Foster D. L, Kaczorowski G. J, Kaback H. R (1983) Mechanism of lactose translocation in proteoliposomes reconstituted with lac carrier protein purified from *Escherichia coli*. 2. Deuterium solvent isotope effects. *Biochemistry* 22(10): 2531–2536

90. Ramos S., Schuldiner S., Kaback H. R. (1976) The electrochemical gradient of protons and its relationship to active transport in *Escherichia coli* membrane vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73(6): 1892–1896
91. Läuger P. (1991) Electrogenic ion pumps. Distinguished lecture series of the Society of General Physiologists, v. 5. Sinauer Associates, Sunderland, Mass., U.S.A.
92. Saier M. H, Reddy V. S, Tamang D. G, Västermark A. (2014) The transporter classification database. *Nucleic Acids Research* 42(D): 251–258
93. Finn R. D, Bateman A, Clements J., Coggill P., Eberhardt R. Y, Eddy S. R, Heger A., Hetherington K., Holm L., Mistry J., Sonnhammer E. LL, Tate J., Punta M. (2014) Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Research* 42(D): 222–230
94. Rees D. C, Johnson E., Lewinson O. (2009) ABC transporters: the power to change. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10(3): 218–227
95. ter Beek J., Guskov A., Slotboom D. J (2014) Structural diversity of ABC transporters. *The Journal of General Physiology* 143(4): 419–435
96. Wilkens S. (2015) Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000prime reports* 7: 14
97. Yan N. (2013) Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends in Biochemical Sciences* 38(3): 151–159
98. Yan N. (2015) Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters. *Annual Review of Biophysics* 44: 257–283
99. Höglund P. J, Nordström K. JV, Schiöth H. B, Fredriksson R. (2011) The solute carrier families have a remarkably long evolutionary history with the majority of the human families present before divergence of Bilaterian species. *Molecular Biology and Evolution* 28(4): 1531–1541
100. Marger M. D, Saier M. H (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends in Biochemical Sciences* 18(1): 13–20
101. Law C. J, Maloney P. C, Wang D.-N. (2008) Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annual Review of Microbiology* 62: 289–305
102. Madej M. G, Dang S., Yan N., Kaback H. R (2013) Evolutionary mix-and-match with MFS transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(15): 5870–5874
103. Rogers K. (2011) Bacteria and viruses, 1st ed. Biochemistry, cells, and life. Britannica Educational Pub. in association with Rosen Educational Services, New York, NY
104. Walmsley A. R, Barrett M. P, Bringaud F., Gould G. W (1998) Sugar transporters from bacteria, parasites and mammals: structure-activity relationships. *Trends in Biochemical Sciences* 23(12): 476–481
105. Chen L.-Q., Cheung L. S, Feng L., Tanner W., Frommer W. B (2015) Transport of sugars. *Annual Review of Biochemistry* 84: 865–894
106. Deng D., Yan N. (2016) GLUT, SGLT, and SWEET: Structural and mechanistic investigations of the glucose transporters. *Protein Science: a Publication of the Protein Society* 25(3): 546–558
107. Feng L., Frommer W. B (2015) Structure and function of SemiSWEET and SWEET sugar transporters. *Trends in Biochemical Sciences* 40(8): 480–486
108. Wright E. M, Loo D. DF, Hirayama B. A (2011) Biology of human sodium glucose transporters. *Physiological Reviews* 91(2): 733–794
109. Crane R. K (1965) Na<sup>+</sup>-dependent transport in the intestine and other animal tissues. *Federation Proceedings* 24(5): 1000–1006
110. Quistgaard E. M, Löw C., Guettou F., Nordlund P. (2016) Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. *Nature reviews. Molecular cell biology* 17(2): 123–132
111. Thorens B., Mueckler M. (2010) Glucose transporters in the 21st Century. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 298(2): E141-5
112. Mueckler M., Thorens B. (2013) The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular Aspects of Medicine* 34(2-3): 121–138
113. Kaback H. R, Smirnova I., Kasho V., Nie Y., Zhou Y. (2011) The alternating access transport mechanism in LacY. *The Journal of Membrane Biology* 239(1-2): 85–93
114. Clore G. M, Venditti V. (2013) Structure, dynamics and biophysics of the cytoplasmic protein-protein complexes of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Trends in Biochemical Sciences* 38(10): 515–530
115. Saier M. H, Hvorup R. N, Barabote R. D (2005) Evolution of the bacterial phosphotransferase system: from carriers and enzymes to group translocators. *Biochemical Society Transactions* 33(Pt 1): 220–224
116. Buttin G., Cohen G. N, Monod J., Rickenberg H. V (1956) La galactoside-perméase d'*Escherichia coli*. *Annales de l'Institut Pasteur* 91(6): 829–857
117. Jacob F., Monod J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology* 3: 318–356
118. Jacob F., Perrin D., Sanchez C., Monod J. (1960) Operon: a group of genes with the expression coordinated by an operator. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* 250: 1727–1729
119. West I. C (1970) Lactose transport coupled to proton movements in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 41(3): 655–661
120. Teather R. M, Müller-Hill B., Abrutsch U., Aichele G., Overath P. (1978) Amplification of the lactose carrier protein in *Escherichia coli* using a plasmid vector. *Molecular & General Genetics (MGG)* 159(3): 239–248
121. Büchel D. E, Gronenborn B., Müller-Hill B. (1980) Sequence of the lactose permease gene. *Nature* 283(5747): 541–545

122. Ehring R., Beyreuther K., Wright J. K., Overath P. (1980) In vitro and in vivo products of E. coli lactose permease gene are identical. *Nature* 283(5747): 537–540
123. Robertson D. E., Kaczorowski G. J., Garcia M. L., Kaback H. R. (1980) Active transport in membrane vesicles from Escherichia coli: the electrochemical proton gradient alters the distribution of the lac carrier between two different kinetic states. *Biochemistry* 19(25): 5692–5702
124. Guan L., Kaback H. R. (2006) Lessons from lactose permease. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 35: 67–91
125. Kaback H. R. (2015) A chemiosmotic mechanism of symport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(5): 1259–1264
126. Henderson P. JF, Baldwin S. A. (2012) Structural biology: Bundles of insights into sugar transporters. *Nature* 490(7420): 348–350
127. Wilson-O'Brien A. L., Patron N., Rogers S. (2010) Evolutionary ancestry and novel functions of the mammalian glucose transporter (GLUT) family. *BMC Evolutionary Biology* 10: 152
128. Oka Y., Asano T., Shibasaki Y., Lin J. L., Tsukuda K., Katagiri H., Akanuma Y., Takaku F. (1990) C-terminal truncated glucose transporter is locked into an inward-facing form without transport activity. *Nature* 345(6275): 550–553
129. Deng D., Xu C., Sun P., Wu J., Yan C., Hu M., Yan N. (2014) Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature* 510(7503): 121–125
130. Abramson J., Smirnova I., Kasho V., Verner G., Kaback H. R., Iwata S. (2003) Structure and mechanism of the lactose permease of Escherichia coli. *Science* 301(5633): 610–615
131. Dang S., Sun L., Huang Y., Lu F., Liu Y., Gong H., Wang J., Yan N. (2010) Structure of a fucose transporter in an outward-open conformation. *Nature* 467(7316): 734–738
132. Sun L., Zeng X., Yan C., Sun X., Gong X., Rao Y., Yan N. (2012) Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1-4. *Nature* 490(7420): 361–366
133. Iancu C. V., Zamoon J., Woo S. B., Aleshin A., Choe J.-y. (2013) Crystal structure of a glucose/H+ symporter and its mechanism of action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(44): 17862–17867
134. Radestock S., Forrest L. R. (2011) The alternating-access mechanism of MFS transporters arises from inverted-topology repeats. *Journal of Molecular Biology* 407(5): 698–715
135. Kumar H., Kasho V., Smirnova I., Finer-Moore J. S., Kaback H. R., Stroud R. M. (2014) Structure of sugar-bound LacY. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(5): 1784–1788
136. Kumar H., Finer-Moore J. S., Kaback H. R., Stroud R. M. (2015) Structure of LacY with an  $\alpha$ -substituted galactoside: Connecting the binding site to the protonation site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(29): 9004–9009
137. Stelzl L. S., Fowler P. W., Sansom M. SP, Beckstein O. (2014) Flexible gates generate occluded intermediates in the transport cycle of LacY. *Journal of Molecular Biology* 426(3): 735–751
138. Mirza O., Guan L., Verner G., Iwata S., Kaback H. R. (2006) Structural evidence for induced fit and a mechanism for sugar/H+ symport in LacY. *The EMBO journal* 25(6): 1177–1183
139. Guan L., Mirza O., Verner G., Iwata S., Kaback H. R. (2007) Structural determination of wild-type lactose permease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(39): 15294–15298
140. Chaptal V., Kwon S., Sawaya M. R., Guan L., Kaback H. R., Abramson J. (2011) Crystal structure of lactose permease in complex with an affinity inactivator yields unique insight into sugar recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(23): 9361–9366
141. Quistgaard E. M., Löw C., Moberg P., Trésaugues L., Nordlund P. (2013) Structural basis for substrate transport in the GLUT-homology family of monosaccharide transporters. *Nature Structural & Molecular Biology* 20(6): 766–768
142. Wisedchaisri G., Park M.-S., Iadanza M. G, Zheng H., Gonen T. (2014) Proton-coupled sugar transport in the prototypical major facilitator superfamily protein XylE. *Nature Communications* 5: 4521
143. Madej M. G, Kaback H. R. (2013) Evolutionary mix-and-match with MFS transporters II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(50): E4831-8
144. Madej M. G, Sun L., Yan N., Kaback H. R. (2014) Functional architecture of MFS D-glucose transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(7): E719-27
145. Madej M. G. (2015) Comparative Sequence-Function Analysis of the Major Facilitator Superfamily: The "Mix-and-Match" Method. *Methods in Enzymology* 557: 521–549
146. Madej M. G, Soro S. N, Kaback H. R. (2012) Apo-intermediate in the transport cycle of lactose permease (LacY). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(44): E2970-8
147. Smirnova I., Kasho V., Kaback H. R. (2011) Lactose permease and the alternating access mechanism. *Biochemistry* 50(45): 9684–9693
148. Park M.-S. (2015) Molecular Dynamics Simulations of the Human Glucose Transporter GLUT1. *PLoS one* 10(4): e0125361

149. Smirnova I., Kasho V., Choe J.-y., Altenbach C., Hubbell W. L., Kaback H. R. (2007) Sugar binding induces an outward facing conformation of LacY. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(42): 16504–16509
150. Västermark Å., Driker A., Li J., Saier M. H. (2015) Conserved movement of TMS11 between occluded conformations of LacY and XylE of the major facilitator superfamily suggests a similar hinge-like mechanism. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 83(4): 735–745
151. Fu X., Zhang G., Liu R., Wei J., Zhang-Negrerie D., Jian X., Gao Q. (2016) Mechanistic Study of Human Glucose Transport Mediated by GLUT1. *Journal of chemical information and modeling*
152. Henderson P. JF, Baldwin S. A. (2013) This is about the in and the out. *Nature Structural & Molecular Biology* 20(6): 654–655
153. Patzlaff J. S, Moeller J. A, Barry B. A, Brooker R. J (1998) Fourier transform infrared analysis of purified lactose permease: a monodisperse lactose permease preparation is stably folded, alpha-helical, and highly accessible to deuterium exchange. *Biochemistry* 37(44): 15363–15375
154. Sayeed W. MH, Baenziger J. E. (2009) Structural characterization of the osmosensor ProP. *Biochimica et Biophysica Acta* 1788(5): 1108–1115
155. Le Coutre J., Kaback H. R, Patel C. K, Heginbotham L., Miller C. (1998) Fourier transform infrared spectroscopy reveals a rigid alpha-helical assembly for the tetrameric *Streptomyces lividans* K<sup>+</sup> channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(11): 6114–6117
156. Liu Z., Madej M. G, Kaback H. R. (2010) Helix dynamics in LacY: helices II and IV. *Journal of Molecular Biology* 396(3): 617–626
157. Zhou Y., Madej M. G, Guan L., Nie Y., Kaback H. R. (2011) An early event in the transport mechanism of LacY protein: interaction between helices V and I. *The Journal of Biological Chemistry* 286(35): 30415–30422
158. Serdiuk T., Madej M. G, Sugihara J., Kawamura S., Mari S. A, Kaback H. R, Müller D. J. (2014) Substrate-induced changes in the structural properties of LacY. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(16): E1571–80
159. Smirnova I., Kasho V., Jiang X., Pardon E., Steyaert J., Kaback H. R. (2015) Transient conformers of LacY are trapped by nanobodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(45): 13839–13844
160. Garcia M. L, Viitanen P., Foster D. L, Kaback H. R. (1983) Mechanism of lactose translocation in proteoliposomes reconstituted with lac carrier protein purified from *Escherichia coli*. 1. Effect of pH and imposed membrane potential on efflux, exchange, and counterflow. *Biochemistry* 22(10): 2524–2531
161. Kaczorowski G. J, Kaback H. R. (1979) Mechanism of lactose translocation in membrane vesicles from *Escherichia coli*. 1. Effect of pH on efflux, exchange, and counterflow. *Biochemistry* 18(17): 3691–3697
162. Kaczorowski G. J, Robertson D. E, Kaback H. R. (1979) Mechanism of lactose translocation in membrane vesicles from *Escherichia coli*. 2. Effect of imposed delata psi, delta pH, and Delta mu H<sup>+</sup>. *Biochemistry* 18(17): 3697–3704
163. Garcia-Celma J. J, Ploch J., Smirnova I., Kaback H. R, Fendler K. (2010) Delineating electrogenic reactions during lactose/H<sup>+</sup> symport. *Biochemistry* 49(29): 6115–6121
164. Smirnova I. N, Kasho V., Kaback H. R. (2008) Protonation and sugar binding to LacY. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(26): 8896–8901
165. Smirnova I., Kasho V., Sugihara J., Kaback H. R. (2011) Opening the periplasmic cavity in lactose permease is the limiting step for sugar binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(37): 15147–15151
166. Smirnova I., Kasho V., Kaback H. R. (2014) Real-time conformational changes in LacY. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(23): 8440–8445
167. Smirnova I., Kasho V., Sugihara J., Kaback H. R. (2009) Probing of the rates of alternating access in LacY with Trp fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(51): 21561–21566
168. Smirnova I. N, Kasho V. N, Kaback H. R. (2006) Direct sugar binding to LacY measured by resonance energy transfer. *Biochemistry* 45(51): 15279–15287
169. Smirnova I., Kasho V., Sugihara J., Kaback H. R. (2013) Trp replacements for tightly interacting Gly-Gly pairs in LacY stabilize an outward-facing conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(22): 8876–8881
170. Guan L., Kaback H. R. (2004) Binding affinity of lactose permease is not altered by the H<sup>+</sup> electrochemical gradient. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(33): 12148–12152
171. Winkler H. H, Wilson T. H. (1966) The role of energy coupling in the transport of beta-galactosides by *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 241(10): 2200–2211
172. Wu J., Kaback H. R. (1994) Cysteine 148 in the lactose permease of *Escherichia coli* is a component of a substrate binding site. 2. Site-directed fluorescence studies. *Biochemistry* 33(40): 12166–12171
173. Sahin-Tóth M., Karlin A., Kaback H. R. (2000) Unraveling the mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(20): 10729–10732

174. Evans D. F, Pye G., Bramley R., Clark A. G, Dyson T. J, Hardcastle J. D (1988) Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut* 29(8): 1035–1041
175. Fallingborg J. (1999) Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Danish Medical Bulletin* 46(3): 183–196
176. Smirnova I., Kasho V., Sugihara J., Vázquez-Ibar J. L, Kaback H. R (2012) Role of protons in sugar binding to LacY. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(42): 16835–16840
177. Smirnova I., Kasho V., Sugihara J., Choe J.-y., Kaback H. R (2009) Residues in the H<sup>+</sup> translocation site define the pK<sub>a</sub> for sugar binding to LacY. *Biochemistry* 48(37): 8852–8860
178. Andersson M., Bondar A.-N., Freitas J. A, Tobias D. J, Kaback H. R, White S. H (2012) Proton-coupled dynamics in lactose permease. *Structure* 20(11): 1893–1904
179. Garcia-Celma J. J, Hatahet L., Kunz W., Fendler K. (2007) Specific anion and cation binding to lipid membranes investigated on a solid supported membrane. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* 23(20): 10074–10080
180. Neher E., Sakmann B. (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. Nature Publ. Group, London
181. Sachs F., Auerbach A. (1983) Single-channel electrophysiology: use of the patch clamp. *Methods in Enzymology* 103: 147–176
182. Cole K. S (1949) Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. *Archives des Sciences Physiologiques* 3: 253–258
183. Marmont G. (1949) Studies on the axon membrane; a new method. *Journal of Cellular Physiology* 34(3): 351–382
184. Neher E., Sakmann B., Steinbach J. H (1978) The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *European Journal of Physiology* 375(2): 219–228
185. Hamill O. P, Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F. J (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *European Journal of Physiology* 391(2): 85–100
186. Numberger M., Draguhn A. (1996) Patch-clamp-Technik. Labor im Fokus. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg
187. Collins M. D, Gordon S. E (2013) Giant liposome preparation for imaging and patch-clamp electrophysiology. *Journal of Visualized Experiments*(76)
188. Müller P., Rudin D. O (1963) Induced excitability in reconstituted cell membrane structure. *Journal of Theoretical Biology* 4(3): 268–280
189. Müller P., Rudin D. O (1967) Action potential phenomena in experimental bimolecular lipid membranes. *Nature* 213(5076): 603–604
190. Müller P., Rudin D. O, Tien H. T, Wescott W. C (1962) Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature* 194: 979–980
191. Läger P. (1985) Mechanismen des biologischen Ionentransports – Carrier, Kanäle und Pumpen in künstlichen Lipidmembranen. *Angewandte Chemie* 97(11): 939–959
192. Montal M., Mueller P. (1972) Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69(12): 3561–3566
193. Tien H., Ottova A. L (2001) The lipid bilayer concept and its experimental realization: From soap bubbles, kitchen sink, to bilayer lipid membranes. *Journal of Membrane Science* 189(1): 83–117
194. Tien H. T, Ottova-Leitmannova A. (2003) Planar lipid bilayers (BLMs) and their applications, 1st ed. Elsevier, Amsterdam, Boston
195. Bamberg E., Apell H.-J., Dencher N. A, Sperling W., Stieve H., Läger P. (1979) Photocurrents generated by bacteriorhodopsin on planar bilayer membranes. *Biophysics of Structure and Mechanism* 5(4): 277–292
196. Bamberg E., Dencher N. A, Fahr A., Heyn M. P (1981) Transmembranous incorporation of photoelectrically active bacteriorhodopsin in planar lipid bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(12): 7502–7506
197. Ellis-Davies G. CR (2007) Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology. *Nature methods* 4(8): 619–628
198. Seifert K., Fendler K., Bamberg E. (1993) Charge transport by ion translocating membrane proteins on solid supported membranes. *Biophysical Journal* 64(2): 384–391
199. Pintschovius J., Fendler K. (1999) Charge translocation by the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase investigated on solid supported membranes: rapid solution exchange with a new technique. *Biophysical Journal* 76(2): 814–826
200. Bazzone A., Costa W. S, Braner M., Călinescu O., Hatahet L., Fendler K. (2013) Introduction to solid supported membrane based electrophysiology. *Journal of Visualized Experiments*(75): e50230
201. Schulz P., Garcia-Celma J. J, Fendler K. (2008) SSM-based electrophysiology. *Methods (San Diego, Calif.)* 46(2): 97–103
202. Love J. C, Estroff L. A, Kriebel J. K, Nuzzo R. G, Whitesides G. M (2005) Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical Reviews* 105(4): 1103–1169
203. Ganea C., Fendler K. (2009) Bacterial transporters: charge translocation and mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787(6): 706–713
204. Mager T., Rimon A., Padan E., Fendler K. (2011) Transport mechanism and pH regulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter NhaA from Escherichia coli: an electrophysiological study. *The Journal of Biological Chemistry* 286(26): 23570–23581

205. Garcia-Celma J. J., Smirnova I. N., Kaback H. R., Fendler K. (2009) Electrophysiological characterization of LacY. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(18): 7373–7378
206. Schulz P., Dueck B., Mourot A., Hatahet L., Fendler K. (2009) Measuring ion channels on solid supported membranes. *Biophysical Journal* 97(1): 388–396
207. Niessen K. V., Muschik S., Langguth F., Rappenglück S., Seeger T., Thiermann H., Worek F. (2016) Functional analysis of *Torpedo californica* nicotinic acetylcholine receptors in multiple activation states by SSM-based electrophysiology. *Toxicology letters* 247: 1–10
208. Schulz P., Werner J., Stauber T., Henriksen K., Fendler K. (2010) The G215R mutation in the Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter CIC-7 found in ADO II osteopetrosis does not abolish function but causes a severe trafficking defect. *PLoS one* 5(9): e12585
209. Grewer C., Gameiro A., Mager T., Fendler K. (2013) Electrophysiological characterization of membrane transport proteins. *Annual Review of Biophysics* 42: 95–120
210. Borlinghaus R., Apell H. J., Läuger P. (1987) Fast charge translocations associated with partial reactions of the Na,K-pump: I. Current and voltage transients after photochemical release of ATP. *The Journal of Membrane Biology* 97(3): 161–178
211. Drachev L. A., Jasaitis A. A., Kaulen A. D., Kondrashin A. A., Liberman E. A., Nemecek I. B., Ostroumov S. A., Semenov A. Y., Skulachev V. P. (1974) Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H<sup>+</sup>-ATPase and bacteriorhodopsin. *Nature* 249(5455): 321–324
212. Michaelis L., Menten M. (1913) Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitung* 49: 333–369
213. Cornish-Bowden A. (2015) One hundred years of Michaelis–Menten kinetics. *Perspectives in Science* 4: 3–9
214. Garcia-Celma J. J., Dueck B., Stein M., Schlueter M., Meyer-Lipp K., Leblanc G., Fendler K. (2008) Rapid activation of the melibiose permease MelB immobilized on a solid-supported membrane. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* 24(15): 8119–8126
215. Fendler K., Jaruschewski S., Hobbs A., Albers W., Froehlich J. P. (1993) Pre-steady-state charge translocation in NaK-ATPase from eel electric organ. *The Journal of General Physiology* 102(4): 631–666
216. Gropp T., Cornelius F., Fendler K. (1998) K<sup>+</sup>-dependence of electrogenic transport by the NaK-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1368(2): 184–200
217. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M. R., Appel R. D., Bairoch A. (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASY Server. In: Walker JM (ed) *The proteomics protocols handbook*. Humana Press, Totowa, N.J., pp 571–607
218. Galla H.-J. (1988) *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*. Thieme, Stuttgart
219. Briggs G. E., Haldane J. B. (1925) A Note on the Kinetics of Enzyme Action. *The Biochemical Journal* 19(2): 338–339
220. Clement N. R., Gould J. M. (1981) Pyranine (8-hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonate) as a probe of internal aqueous hydrogen ion concentration in phospholipid vesicles. *Biochemistry* 20(6): 1534–1538
221. Kano K., Fendler J. H. (1978) Pyranine as a sensitive pH probe for liposome interiors and surfaces. pH gradients across phospholipid vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta* 509(2): 289–299
222. Norris F. A., Powell G. L. (1990) The apparent permeability coefficient for proton flux through phosphatidylcholine vesicles is dependent on the direction of flux. *Biochimica et Biophysica Acta* 1030(1): 165–171
223. Singh A. P., Nicholls P. (1985) Cyanine and safranin dyes as membrane potential probes in cytochrome c oxidase reconstituted proteoliposomes. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 11(2-3): 95–108
224. Ivkova M. N., Pechatnikov V. A., Ivkov V. G. (1984) Mechanism of fluorescent response of the probe diS-C3-(5) to transmembrane potential changes in a lecithin vesicle suspension. *General Physiology and Biophysics* 3(2): 97–117
225. Ujwal M. L., Sahin-Tóth M., Persson B., Kaback H. R. (1994) Role of glutamate-269 in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Molecular Membrane Biology* 11(1): 9–16
226. Sandermann H. (1977) beta-D-Galactoside transport in *Escherichia coli*: substrate recognition. *European Journal of Biochemistry (FEBS)* 80(2): 507–515
227. Bradley S. A., Tinsley C. R., Muir J. A., Henderson P. J. (1987) Proton-linked L-fucose transport in *Escherichia coli*. *The Biochemical Journal* 248(2): 495–500
228. Sumiya M., Davis E. O., Packman L. C., McDonald T. P., Henderson P. J. (1995) Molecular genetics of a receptor protein for D-xylose, encoded by the gene xylF, in *Escherichia coli*. *Receptors & Channels* 3(2): 117–128
229. Lolkema J. S., Carrasco N., Kaback H. R. (1991) Kinetic analysis of lactose exchange in proteoliposomes reconstituted with purified lac permease. *Biochemistry* 30(5): 1284–1290
230. Segel I. H. (1975) *Enzyme kinetics: Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems*. Wiley, New York
231. Neet K. E., Ainslie G. R. (1980) Hysteretic enzymes. *Methods in Enzymology* 64: 192–226
232. Whitehead E. P. (1976) Simplifications of the derivations and forms of steady-state equations for non-equilibrium random substrate-modifier and allosteric enzyme mechanisms. *The Biochemical Journal* 159(3): 449–456
233. Stein R. L. (2011) *Kinetics of enzyme action: Essential principles for drug hunters*. Wiley, Hoboken, N.J.
234. Sugihara J., Smirnova I., Kasho V., Kaback H. R. (2011) Sugar recognition by CscB and LacY. *Biochemistry* 50(51): 11009–11014

235. Muiry J. A, Gunn T. C, McDonald T. P, Bradley S. A, Tate C. G, Henderson P. J (1993) Proton-linked L-rhamnose transport, and its comparison with L-fucose transport in Enterobacteriaceae. *The Biochemical Journal* 290(3): 833–842
236. Henderson P. J, Maiden M. C (1990) Homologous sugar transport proteins in *Escherichia coli* and their relatives in both prokaryotes and eukaryotes. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 326(1236): 391–410
237. Sahin-Tóth M., Lawrence M. C, Nishio T., Kaback H. R (2001) The C-4 hydroxyl group of galactopyranosides is the major determinant for ligand recognition by the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 40(43): 13015–13019
238. Fersht A. (1985) Enzyme structure and mechanism, 2nd ed. W.H. Freeman, New York
239. Parray H. A, Yun J. W (2015) Proteomic Identification of Target Proteins of Thiodigalactoside in White Adipose Tissue from Diet-Induced Obese Rats. *International journal of molecular sciences* 16(7): 14441–14463
240. McEvoy G. K (2003) AHFS Drug information 2003. American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, Md.
241. He M. M, Kaback H. R (1997) Interaction between residues Glu269 (helix VIII) and His322 (helix X) of the lactose permease of *Escherichia coli* is essential for substrate binding. *Biochemistry* 36(44): 13688–13692
242. Nie Y., Smirnova I., Kasho V., Kaback H. R (2006) Energetics of ligand-induced conformational flexibility in the lactose permease of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 281(47): 35779–35784
243. Garcia M. L, Patel L., Padan E., Kaback H. R (1982) Mechanism of lactose transport in *Escherichia coli* membrane vesicles: Evidence for the involvement of a histidine residue(s) in the response of the lac carrier to the proton electrochemical gradient. *Biochemistry* 21(23): 5800–5805
244. Avnir Y., Barenholz Y. (2005) pH determination by pyranine: medium-related artifacts and their correction. *Analytical Biochemistry* 347(1): 34–41
245. Ahmed S., Booth I. R (1983) The use of valinomycin, nigericin and trichlorocarbonyl in control of the protonmotive force in *Escherichia coli* cells. *The Biochemical Journal* 212(1): 105–112
246. Plásek J., Dale R. E, Sigler K., Laskay G. (1994) Transmembrane potentials in cells: a diS-C3(3) assay for relative potentials as an indicator of real changes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1196(2): 181–190
247. Clement N. R, Gould M. J (1981) Modulation by small hydrophobic molecules of valinomycin-mediated potassium transport across phospholipid vesicle membranes. *Biochemistry* 20(6): 1539–1543
248. Cooper C. E, Wrigglesworth J. M, Nicholls P. (1990) The mechanism of potassium movement across the liposomal membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 173(3): 1008–1012
249. Tsai M.-F., Miller C. (2013) Substrate selectivity in arginine-dependent acid resistance in enteric bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(15): 5893–5897
250. Fang G., Friesen R., Lanfermeijer F., Hagting A., Poolman B., Konings W. N (1999) Manipulation of activity and orientation of membrane-reconstituted di-tripeptide transport protein DtpT of *Lactococcus lactis*. *Molecular Membrane Biology* 16(4): 297–304
251. Grzesiek S., Dencher N. A (1986) Dependency of delta pH-relaxation across vesicular membranes on the buffering power of bulk solutions and lipids. *Biophysical Journal* 50(2): 265–276
252. Perkins W. R, Cafiso D. S (1987) Characterization of H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup> currents in phospholipid vesicles. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 19(5): 443–455
253. Deamer D. W, Nichols J. W (1983) Proton-hydroxide permeability of liposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80(1): 165–168
254. Johnson S. M, Bangham A. D (1969) Potassium permeability of single compartment liposomes with and without valinomycin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 193(1): 82–91
255. Laidler K. J (1978) Physical chemistry with biological applications. Benjamin/Cummings Pub. Co, Menlo Park, Calif.
256. Maróti P., Wraight C. A (1997) Kinetics of H<sup>+</sup> ion binding by the P<sup>+</sup>QA-state of bacterial photosynthetic reaction centers: rate limitation within the protein. *Biophysical Journal* 73(1): 367–381
257. Glasoe P. K, Long F. A (1960) Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide. *The Journal of Physical Chemistry* 64(1): 188–190
258. Small P., Blankenhorn D., Welty D., Zinser E., Slonczewski J. L (1994) Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of rpoS and growth pH. *Journal of Bacteriology* 176(6): 1729–1737
259. Lambers H., Piessens S., Bloem A., Pronk H., Finkel P. (2006) Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *International Journal of Cosmetic Science* 28(5): 359–370
260. Ganea C., Pourcher T., Leblanc G., Fendler K. (2001) Evidence for intraprotein charge transfer during the transport activity of the melibiose permease from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 40(45): 13744–13752
261. Garcia-Celma J., Szydelko A., Dutzler R. (2013) Functional characterization of a CIC transporter by solid-supported membrane electrophysiology. *The Journal of General Physiology* 141(4): 479–491

262. van Wezel G. P, Mahr K., König M., Traag B. A, Pimentel-Schmitt E. F, Willimek A., Titgemeyer F. (2005) GlcP constitutes the major glucose uptake system of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology* 55(2): 624–636
263. Du J., Li S., Zhao H. (2010) Discovery and characterization of novel d-xylose-specific transporters from *Neurospora crassa* and *Pichia stipitis*. *Molecular bioSystems* 6(11): 2150–2156
264. Leandro M. J, Gonçalves P., Spencer-Martins I. (2006) Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: first molecular characterization of a yeast xylose-H<sup>+</sup> symporter. *The Biochemical Journal* 395(3): 543–549
265. Young E., Poucher A., Comer A., Bailey A., Alper H. (2011) Functional survey for heterologous sugar transport proteins, using *Saccharomyces cerevisiae* as a host. *Applied and Environmental Microbiology* 77(10): 3311–3319
266. Farwick A., Bruder S., Schadeweg V., Oreb M., Boles E. (2014) Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(14): 5159–5164
267. Deutscher J. (2008) The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 11(2): 87–93
268. Neidhardt F. C, Curtiss R. (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
269. Jordan P. C (1979) *Chemical kinetics and transport*. Plenum Press, New York
270. Haar D. T (1955) Foundations of Statistical Mechanics. *Reviews of Modern Physics* 27(3): 289–338
271. Lewis G. N (1925) A New Principle of Equilibrium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 11(3): 179–183
272. Wegscheider R. (1901) Über simultane Gleichgewichte und die Beziehungen zwischen Thermodynamik und Reaktionskinetik homogener Systeme. *Monatshefte für Chemie* 22(8): 849–906
273. Alberty R. A (2004) Principle of Detailed Balance in Kinetics. *Journal of Chemical Education* 81(8): 1206
274. Kuhn H., Försterling H.-D., Waldeck D. H (2009) *Principles of physical chemistry*, 2nd ed. John Wiley, Hoboken, N.J.
275. Padan E., Zilberstein D., Rottenberg H. (1976) The proton electrochemical gradient in *Escherichia coli* cells. *European Journal of Biochemistry (FEBS)* 63(2): 533–541
276. Ferraris R. P, Yasharpour S., Lloyd K. C, Mirzayan R., Diamond J. M (1990) Luminal glucose concentrations in the gut under normal conditions. *The American Journal of Physiology* 259(5 Pt 1): G822-37
277. Rivero-Marcotegui A., Olivera-Olmedo J. E, Valverde-Visus F. S, Palacios-Sarrasqueta M., Grijalba-Uche A., García-Merlo S. (1998) Water, fat, nitrogen, and sugar content in feces: reference intervals in children. *Clinical Chemistry* 44(7): 1540–1544
278. Gray G. M (1975) Carbohydrate digestion and absorption. Role of the small intestine. *The New England Journal of Medicine* 292(23): 1225–1230
279. Tran Q. H, Uden G. (1998) Changes in the proton potential and the cellular energetics of *Escherichia coli* during growth by aerobic and anaerobic respiration or by fermentation. *European Journal of Biochemistry (FEBS)* 251(1-2): 538–543
280. Newman M. J, Foster D. L, Wilson T. H, Kaback H. R (1981) Purification and reconstitution of functional lactose carrier from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 256(22): 11804–11808
281. Gaiko O., Bazzone A., Fendler K., Kaback H. R (2013) Electrophysiological characterization of uncoupled mutants of LacY. *Biochemistry* 52(46): 8261–8266
282. Page M. G, Rosenbusch J. P, Yamato I. (1988) The effects of pH on proton sugar symport activity of the lactose permease purified from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 263(31): 15897–15905
283. Alberty R. A, Hammes G. G (1958) Application of the Theory of Diffusion-controlled Reactions to Enzyme Kinetics. *The Journal of Physical Chemistry* 62(2): 154–159
284. Overath P., Teather R. M, Simoni R. D, Aichele G., Wilhelm U. (1979) Lactose carrier protein of *Escherichia coli*. Transport and binding of 2'-(N-dansyl)aminoethyl beta-D-thiogalactopyranoside and p-nitrophenyl alpha-D-galactopyranoside. *Biochemistry* 18(1): 1–11
285. Rudnick G., Schildiner S., Kaback H. R (1976) Equilibrium between two forms of the lac carrier protein in energized and nonenergized membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 15(23): 5126–5131
286. Klingenberg M. (2005) Ligand-protein interaction in biomembrane carriers. The induced transition fit of transport catalysis. *Biochemistry* 44(24): 8563–8570
287. Sahin-Toth M., Kaback H. R (2001) Arg-302 facilitates deprotonation of Glu-325 in the transport mechanism of the lactose permease from *Escherichiacoli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(11): 6068–6073
288. Kaback H. R, Sahin-Tóth M., Weinglass A. B (2001) The kamikaze approach to membrane transport. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2(8): 610–620
289. Naftalin R. J, Green N., Cunningham P. (2007) Lactose permease H<sup>+</sup>-lactose symporter: mechanical switch or Brownian ratchet? *Biophysical Journal* 92(10): 3474–3491
290. Herzlinger D., Viitanen P., Carrasco N., Kaback H. R (1984) Monoclonal antibodies against the lac carrier protein from *Escherichia coli*. 2. Binding studies with membrane vesicles and proteoliposomes reconstituted with purified lac carrier protein. *Biochemistry* 23(16): 3688–3693
291. Lam V. M, Daruwalla K. R, Henderson P. J, Jones-Mortimer M. C (1980) Proton-linked D-xylose transport in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 143(1): 396–402

292. Kashket E. R (1985) The proton motive force in bacteria: a critical assessment of methods. *Annual Review of Microbiology* 39: 219–242
293. Patel L., Garcia M. L., Kaback H. R (1982) Direct measurement of lactose/proton symport in *Escherichia coli* membrane vesicles: further evidence for the involvement of histidine residue(s). *Biochemistry* 21(23): 5805–5810
294. Madej M. G (2014) Function, Structure, and Evolution of the Major Facilitator Superfamily: The LacY Manifesto. *Advances in Biology* 2014(11 i): 1–20
295. Zhou Y., Jiang X., Kaback H. R (2012) Role of the irreplaceable residues in the LacY alternating access mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(31): 12438–12442
296. Padan E., Sarkar H. K., Viitanen P. V., Poonian M. S., Kaback H. R (1985) Site-specific mutagenesis of histidine residues in the lac permease of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82(20): 6765–6768
297. Padan E., Patel L., Kaback H. R (1979) Effect of diethylpyrocarbonate on lactose/proton symport in *Escherichia coli* membrane vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(12): 6221–6225
298. Andreeva I. G., Golubeva L. I., Katashkina J. I (2013) Putative GalP, XylE, and FucP H<sup>+</sup> symporters from *Pantoea ananatis* are capable of transporting glucose into *Escherichia coli* cells. *Applied Biochemistry and Microbiology* 49(7): 638–645
299. Olsson M. HM, Søndergaard C. R., Rostkowski M., Jensen J. H (2011) PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. *Journal of Chemical Theory and Computation* 7(2): 525–537
300. Søndergaard C. R., Olsson M. HM, Rostkowski M., Jensen J. H (2011) Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pKa Values. *Journal of Chemical Theory and Computation* 7(7): 2284–2295
301. Hinsen K. (2000) The molecular modeling toolkit: A new approach to molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry* 21(2): 79–85
302. Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C., Ferrin T. E (2004) UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 25(13): 1605–1612
303. Haas A. H., Lancaster C. RD (2004) Calculated coupling of transmembrane electron and proton transfer in dihemic quinol:fumarate reductase. *Biophysical Journal* 87(6): 4298–4315
304. Kannt A., Lancaster C. R., Michel H. (1998) The coupling of electron transfer and proton translocation: electrostatic calculations on *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase. *Biophysical Journal* 74(2 Pt 1): 708–721
305. Sugihara J., Sun L., Yan N., Kaback H. R (2012) Dynamics of the L-fucose/H<sup>+</sup> symporter revealed by fluorescence spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(37): 14847–14851
306. Berge C. (1962) The theory of graphs and its applications. Methuen; Wiley, London, New York
307. Khokhar D. (2015) Gephi cookbook. Packt Publishing, Birmingham, UK
308. Lutter R., Abrahams J. P., van Raaij M. J., Todd R. J., Lundqvist T., Buchanan S. K., Leslie A. G., Walker J. E (1993) Crystallization of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Journal of Molecular Biology* 229(3): 787–790
309. Girvan M., Newman M. EJ (2002) Community structure in social and biological networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(12): 7821–7826
310. Newman M. EJ (2004) Analysis of weighted networks. *Physical Review E* 70(5)
311. Frillingos S., Sahin-Tóth M., Wu J., Kaback H. R (1998) Cys-scanning mutagenesis: a novel approach to structure function relationships in polytopic membrane proteins. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 12(13): 1281–1299
312. Nie Y., Ermolova N., Kaback H. R (2007) Site-directed alkylation of LacY: effect of the proton electrochemical gradient. *Journal of Molecular Biology* 374(2): 356–364
313. Nie Y., Sabetfard F. E., Kaback H. R (2008) The Cys154–Gly mutation in LacY causes constitutive opening of the hydrophilic periplasmic pathway. *Journal of Molecular Biology* 379(4): 695–703
314. Kirchoff H., Tremmel I., Haase W., Kubitschek U. (2004) Supramolecular photosystem II organization in grana thylakoid membranes: evidence for a structured arrangement. *Biochemistry* 43(28): 9204–9213
315. Liu Y., Ke M., Gong H. (2015) Protonation of Glu(135) Facilitates the Outward-to-Inward Structural Transition of Fucose Transporter. *Biophysical Journal* 109(3): 542–551
316. Franco P. J., Brooker R. J (1991) Evidence that the asparagine 322 mutant of the lactose permease transports protons and lactose with a normal stoichiometry and accumulates lactose against a concentration gradient. *The Journal of Biological Chemistry* 266(11): 6693–6699
317. Lee J. I., Varela M. F., Wilson T. H (1996) Physiological evidence for an interaction between Glu-325 and His-322 in the lactose carrier of *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1278(1): 111–118

## Abkürzungsverzeichnis

Übersicht häufig verwendeter Abkürzungen.

Abkürzungen für Chemikalien sind [Tabelle 4](#) (Seite 38) zu entnehmen.

**OE-Mutante** – *only-Exchange* Mutanten der MFS Zucker-transporter, bei denen die Protonen-Bindestelle durch eine neutrale Aminosäure substituiert ist (E325A LacY, D27N XylE, D46N FucP, D22N GlcP)

**MKM** – Minimales kinetisches Model

**MFS** – *Major facilitator superfamily*

**TMD** – Transmembrandomäne

**Wt** – Wildtyp

**LacY** – Lactose Permease

**FucP** – Fucose Transporter

**XylE** – Xylose Transporter

**GlcP** – Glucose Transporter

**MelB** – Melibiose Permease

**GLUT** – humaner Glucose Transporter

**SGLT** – Natrium-Glucose-Cotransporter

**rso** – *right-side out* (Orientierung des Transporters innerhalb der Lipidmembran)

**iso** – *inside out* (Orientierung des Transporters innerhalb der Lipidmembran)

**PMF** – Protonenmotorische Kraft

**BLM** – *black lipid membrane*

**TEVC** – *Two Electrode Voltage Clamp*; Zweielektrodenspannungsklemme

**SSM** – *Solid Supported Membrane*; Festkörper unterstützte Lipidmembran

**SAM** – Selbstassemblierender Monolayer

**MF** – Membranfragmente

**PM** – Proteoliposomale Membran

**LPR** – Lipid zu Protein Verhältnis (w/w)

**TCDB** – Transporter Classification Database

**PDB** – Protein Databank

**A** – aktivierende Lösung (enthält das Zuckersubstrat)

**NA** – Nichtaktivierende Lösung

**R** – Ruhelösung (pH entspricht dem im Experiment einzustellenden intraliposomalem pH-Wert)

**Sug** – Zucker

**P<sub>out</sub> / P<sub>o</sub>** – Transporter in auswärtsgerichteter Konformation

**P<sub>in</sub> / P<sub>i</sub>** – Transporter in einwärtsgerichteter Konformation

**P** – leerer Carrier (negativ geladen)

**PH** – protonierter bzw. neutralisierter Carrier

**PS** – unprotonierter, Zucker-beladener Carrier (negativ geladen)

**PSH** – vollständig beladener Carrier

**BC** – beladener Carrier

**LC** – leerer Carrier

**BLC** – beladener und leerer Carrier

## Variablenverzeichnis

Übersicht häufig verwendeter Abkürzungen für Variablen und Parameter

### **Konzentrationen von Transporter-Zuständen**

**cP<sub>o</sub>** – Transporter-Konzentration in auswärtsgerichteter Konformation

**cP<sub>i</sub>** – Transporter-Konzentration in einwärtsgerichteter Konformation

**cP** – Transporter-Konzentration des leeren Carriers (negativ geladen)

**cPH** – Transporter-Konzentration des protonierten, neutralisierten Carriers

**cPS** – Transporter-Konzentration des Zucker-gebundenen Carriers (negativ geladen)

**cPHS** – Transporter-Konzentration des vollständig beladenen Carriers

**Thermodynamische Parameter**

**KS** – Halbsättigungskonzentration der Zuckerbindung im MKM

**pKa** – experimentell bestimmter, apparenter pK-Wert der Protonenfreisetzungsreaktion

**pKb** – experimentell bestimmter, apparenter pK-Wert der Protonenbindungsreaktion (pKb<sub>1/2</sub>, wenn mehr als ein pK-Wert bestimmt wurde)

**pKi** – aus theoretischen Berechnungen oder kinetischen Simulationen erhaltener\_realer pK-Wert der Protonenfreisetzungsreaktion

**pKo** – aus theoretischen Berechnungen oder kinetischen Simulationen erhaltener\_realer pK-Wert der Protonenbindungsreaktion

**ΔpKapp** – Differenz aus pKa und pKb

**ΔpKsim / ΔpKtheo** – Differenz aus pKi und pKo

**ΔG<sup>0</sup>** – Energiedifferenz zwischen zwei Transporter-Zuständen

**ΔG\*** – Aktivierungsenergie

**Kinetische Parameter**

**KD** – In den OE-Mutanten der *E.coli* Transporter die Halbsättigungskonzentration des Peakstroms der *pre steady-state* Komponente (in wt GlcP: Halbsättigungskonzentration der Ladung)

**KM** – Halbsättigungskonzentration des Peakstroms der *steady-state* Komponente in wt Transportern

**U** – Umsatzrate aus kinetischer Simulation

**R** – *Detailed Balance* Faktor

**k** – Reaktionsgeschwindigkeitskonstante

**kf** – Vorwärtsrate d. Konformationsänderung des beladenen Carriers beim einwärtsgerichteten Symport

**kr** – Rückwärtsrate d. Konformationsänderung des beladenen Carriers beim einwärtsgerichteten Symport

**jf** – Vorwärtsrate d. Konformationsänderung des leeren Carriers beim einwärtsgerichteten Symport

**jr** – Rückwärtsrate d. Konformationsänderung des leeren Carriers beim einwärtsgerichteten Symport

**Äußere Bedingungen**

**Δμ<sub>H+</sub>** – elektrochemisches Potential der Protonen

**Δφ** – Transmembranes Membranpotential

**U<sub>m</sub>** – Transmembranes Membranpotential

**ΔpH** – pH-Gradient über die PM

**pHi** – innerer pH-Wert (intraliposomal bzw. zytoplasmatisch)

**pHo** –äußerer pH-Wert (extraliposomal bzw. extrazellulär)

**pH(NA)** – pH-Wert der nichtaktivierenden Lösung

**pH(R)** – pH-Wert der Ruhelösung

**pH(A)** – pH-Wert der aktivierenden Lösung

**csi** – innere Zuckerkonzentration (intraliposomal bzw. zytoplasmatisch)

**cso** – äußere Zuckerkonzentration (extraliposomal bzw. extrazellulär)

**Δcs** – Zuckergradient über die PM

**SSM Signale**

**Q** – Ladung bzw. Peak-Integral

**I<sub>P</sub>** - Peakstrom

**I<sub>S</sub>** – stationärer Strom (aus Rekonstruktion der transienten Ströme)

**Imax / vmax** – maximale Transportrate aus dem Fit der Konzentrationsabhängigkeit mittels Michaelis-Menten Gleichung oder der kinetischen Simulation

**τ<sub>2</sub>** – Abklingzeit des transienten Stroms (aus monoexponentiellem Fit des Signalabfalls)

**τ<sub>1</sub>** – Anstiegszeit des transienten Stroms (aus monoexponentiellem Fit des Signalanstiegs)

**τ<sub>0</sub>** – Systemzeitkonstante

## Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei allen Studenten bedanken, die ich im Rahmen meiner Promotionstätigkeit betreuen durfte, die mir ihr Vertrauen und eine ergebnisreiche Mitarbeit geschenkt haben. In *Tabelle 30* sind sie und ihre Beiträge in chronologischer Reihenfolge ihrer Mitwirkung gelistet.

**Tabelle 30: Im Rahmen der Dissertation betreute Praktika und Abschlussarbeiten.** Nachweise im Rahmen der einzelnen Arbeiten entstandener Ergebnisse.

	Art und Thema der Arbeit	Verwendete Ergebnisse
<b>Özgül Koc</b>	Diplomarbeit, Biowissenschaften D46N FucP	--
<b>Emanuel Peplau</b>	Praktikum	--
<b>Merlin Kappenstein</b>	Bachelorarbeit, Biophysik I172A XylE	Abbildung 68 (Seite A15) Tabelle 32 (Seite A14)
<b>Derya Kurt</b>	Bachelorarbeit, Chemie Q175I/L297F XylE	Abbildung 49 (Seite 132) Tabelle 24 (Seite 131)
<b>Derya Kurt</b>	Weiterführendes Praktikum D-Glucose und wt XylE	Tabelle 13 (Seite 79), XylE
<b>Maximilian Schneider</b>	Masterarbeit, Biosystemtechnik Stabilität von pH Gradienten	Abbildung 30 (Seite 92) Abbildung 31 (Seite 93)
<b>Maximilian Schneider</b>	Weiterführendes Praktikum Potentialmessungen	Tabelle 17 (Seite 95)
<b>Annas Jomaa Zabadne</b>	Bachelorarbeit, Biophysik D22N und I105S GlcP	Abbildung 42 (Seite 119) Abbildung 69 (Seite A16) Abbildung 70 (Seite A17)
<b>Annas Jomaa Zabadne</b>	Weiterführendes Praktikum Zuckerspezifitäten in wt GlcP	Abbildung 43 (Seite 120) Tabelle 22 (Seite 121) Abbildung 44 (Seite 121)
<b>Tim Engelmann</b>	Praktikum, Biophysik D46N FucP	Abbildung 66 (Seite A12)
<b>Laura Schulz</b>	Bachelorarbeit, Biophysik Zuckeraffinitäten sekundärer Substrate	Abbildung 26b,e,f (Seite 81) Tabelle 15 (Seite 85) Tabelle 16 (Seite 87) Abbildung 29b (Seite 88)
<b>Mehmet Karabel</b>	Bachelorarbeit, Chemie pH-Abhängigkeiten sekundärer Substrate	Abbildung 36d (Seite 106) Abbildung 47, pH > 8 (Seite 129)

Ein herzliches Dankeschön möchte ich an **Prof. Dr. Klaus Fendler** richten. Einerseits für die Möglichkeit an diesem sehr interessanten Forschungsthema in einem fruchtbaren und kommunikativen Umfeld arbeiten zu dürfen. Aber auch insbesondere für seine intensive und engagierte Betreuung meiner Arbeit. Auch **Prof. Dr. Ernst Bamberg** danke ich für die kontinuierliche Unterstützung meiner Projekte.

Für die Möglichkeit des Forschungsaufenthalts in der Abteilung für Physiologie der David Geffen School of Medicine (University of California, Los Angeles) und der kontinuierlichen Unterstützung in meinen Forschungsvorhaben danke ich **Prof. Dr. H. Ron Kaback** und seinem ganzen Team. Insbesondere sind **Dr. M. Gregor Madej** und **Junichi Sugihara** zu nennen, die mich tagtäglich vor Ort unterstützten.

Für zahlreiche, hilfreiche Diskussionen richte ich ein großes Dankeschön an **Dr. Thomas Mager**, **Dr. Octavian Călinescu** und **Dr. M. Gregor Madej**. **Dr. M. Gregor Madej** gilt einen besonderen Dank für seine hervorragenden Beiträge zu den gemeinsamen Publikationen und die immer treffenden Literaturhinweise aus der 40jährigen Forschungsgeschichte von LacY.

Für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der radioaktiven Transportassays möchte ich mich bei **Rainer Thiel** und **Anastasia Salisovski** bedanken. Für die elektronenmikroskopischen Gefrierbruch-Aufnahmen bedanke ich mich bei **Friederike Joos**.

Für die alltägliche Unterstützung und die reibungslosen Abläufe im Labor bedanke ich mich bei **Lina Hatahet** und **Mark Linder**, insbesondere auch dafür, dass sie für meine Studenten da waren, wenn ich es gerade nicht sein konnte.

**Prof. Dr. H. Ron Kaback** und **Junichi Sugihara** (David Geffen School of Medicine, University of California, Los Angeles) danke ich für die Zusendung des Plasmids zur Expression von FucP. Auch bedanke ich mich herzlich für die Präparation von wt und E325A LacY beim Team um Prof. Dr. H. Ron Kaback. **Prof. Dr. Nieng Yan** und **Linfeng Sun** (Center for Structural Biology, Tsinghua University, Beijing) danke ich für die Zusendung des Plasmids zur Expression von XylE. Für das Plasmid zur Expression von GlcP bedanke ich mich bei **Prof. Dr. Jun-yong Choe** und **Cristina V. Iancu** (The Chicago Medical School, Rosalind Franklin University of Medicine and Science, Chicago).

Für das Lesen des Manuskripts und die vielen hilfreichen Kommentare bedanke ich mich bei **Prof. Dr. Klaus Fendler** und **Wagner Steuer Costa**. Außerdem bedanke ich mich herzlich bei Prof. Dr. Klaus Fendler und **Prof. Dr. Klaas Martinus Pos** für die Begutachtung meiner Arbeit.

Zuletzt möchte ich nochmal all jenen danken, welche die vergangenen Jahre nicht nur ertragreich, sondern auch wunderschön und unvergesslich gemacht haben. Dazu zählt insbesondere das Team um Prof. Dr. Ernst Bamberg und Prof. Dr. Klaus Fendler, aber auch das Umfeld der Graduiertenschule *tram* sowie die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Ron Kaback.



Arbeitsgruppe Ernst Bamberg (2015)



Betriebsausflug in die Rhön, Arbeitsgruppe Ernst Bamberg (2015)



Arbeitsgruppe Klaus Fendler (2015)



tram student retreat (2014)



Arbeitsgruppe Ron Kaback (2012)



Max-Planck Institut für Biophysik, Campus Riedberg





# 6

---

## ANHANG

---

### Empirische pK-Kalkulationen

Die experimentell bestimmten pK-Werte (*Seite 103, Tabelle 19*) können mittels pK-Wert-Rechnungen auf Basis der 3D-Strukturen zu einzelnen Aminosäuren und Transporter-Konformationen zugeordnet werden. Die hier präsentierten empirischen pK-Rechnungen wurden in Kollaboration mit Dr. Gregor Madej durchgeführt.

#### **Methode**

Die pKa-Werte der Aminosäure-Seitenketten wurden mithilfe einer empirischen Methode auf Basis der Protein-Strukturen berechnet [299]. Dazu wurde die Software PROPKA verwendet und nichtkovalente Interaktionen berücksichtigt. Der zugrundeliegende Algorithmus erweitert den Standard-Parametersatz von PROPKA und basiert darauf, dass zwei titrierbare, benachbarte, aber nicht kovalent gebundene Gruppen auf gekoppelte Weise titrieren. Dieses Phänomen kann die makroskopische Titrationskurve beeinflussen, welche dann nicht mehr eine Standard-Henderson-Hasselbalch-Form aufweist.

Die pK-Werte sind jeweils die Summe aus dem  $pK^{H_2O}$  Wert der titrierbaren Gruppe in Wasser und dem Beitrag des  $\Delta pK^\pi$  Wertes, der sich aus der Proteinumgebung der jeweiligen titrierbaren Gruppe ergibt.  $\Delta pK^\pi$  setzt sich aus verschiedenen Beiträgen zusammen, welche Solvatationseffekte ( $\Delta pK_a^d$ ), Wasserstoffbrücken ( $\Delta pK_a^H$ ), ungünstige elektrostatische Reorganisation ( $\Delta pK_a^R$ ) und Coulomb-Wechselwirkungen ( $\Delta pK_a^Q$ ) berücksichtigen. Zwei Gruppen werden als gekoppelt betrachtet, wenn alle der folgenden Kriterien erfüllt sind:

- (1) Die Differenz der intrinsischen pK-Werte der zwei Gruppen ist nicht größer als 2,0 pK-Einheiten,

- (2) Die Interaktionsenergie zwischen den zwei interagierenden Gruppen muss mindestens 0,5 pK-Einheiten entsprechen,
- (3) Die Differenz der freien Energie zwischen den zwei möglichen Protonierungszuständen ist nicht größer als 1,0 pK-Einheiten und
- (4) die Verschiebung der pK-Werte bei Wechsel des Protonierungszustands ist größer als 1,0 pK-Einheiten.

Sind zwei Gruppen gekoppelt, werden die alternativen Protonierungszustände berechnet [300]. Für die Berechnungen werden die entsprechenden Kristallographischen Datensätze aus der PDB verwendet: 2CFQ, 4OOA (LacY), 4QIQ, 4GBY (XylE) und 3O7Q (FucP). Nicht für alle Transporter sind passende Strukturdaten vorhanden. In diesen Fällen werden die entsprechenden Konformationen auf Basis der vorhandenen Strukturen wie folgt generiert.

Für LacY sind keine strukturellen Informationen für den Zustand nach der Dissoziation des Protons verfügbar. Dennoch können die elektrostatischen Interaktionen von der Substrat-okkludierten Struktur (4OAA) unter folgenden Annahmen extrapoliert werden: (1) Nach der Dissoziation des Zuckers finden keine globalen Konformationsänderungen innerhalb des C-terminalen 6-Helixbündels statt, (2) die Wasserstoffbrücke zwischen E325-Oε2 und H322-δN bleibt bestehen und (3) der Winkel der Wasserstoffbrücke zwischen H322 und E325 wird bezüglich einer optimalen Interaktion angepasst. So werden nach Entfernen von TDG aus dem 4OAA-Datensatz die Koordinaten der Reste Y236, D240, E269, K319, H322 und E325 einer Energieminimierung (1000 Schritte, 0,02 Å pro Schritt) unterzogen. Dazu wird das Molecular Modeling Toolkit (MMTK) und ein AMBER 94 Kraftfeld in Chimera verwendet [301, 302].

Für FucP wurde der Substrat-gebundene Zustand emuliert, indem das β-Nonylglucosid aus den PDB-Koordinaten (3O7Q) entfernt wurde. Auf Basis der LacY-Koordinaten wurde anschließend die Wasserstoffbrücke zwischen N42 und Y101 entfernt. Nach Hinzufügen eines Protons an D46 wurden die Konformationen der Reste N42, N43, N45, D46 und Y101 durch Energieminimierung neu berechnet. Der deprotonierte Zustand von FucP wurde auf analoge Weise, jedoch mit negativ geladenem D46 entwickelt.

## Ergebnisse

Das SSM-Experiment (Seite 103, Tabelle 19) und Simulationen des MKM (Seite 139, Tabelle 26) zeigen deutlich, dass die Transporter unterschiedliche pK-Werte für die periplasmatische Protonenbindung und die zytoplasmatische Protonenfreisetzung aufweisen. Daher muss im Verlaufe des Transportzyklus eine pK-Verschiebung stattfinden. Auf Basis der 3D-Strukturen können die pK-Werte verschiedener Aminosäuren in unterschiedlichen Transporter-Konformationen berechnet werden,

wie im vorangehenden Abschnitt beschrieben. Damit sind Rückschlüsse über die Konformationsänderungen möglich, die zur Verschiebung der pK-Werte beitragen. In [Tabelle 31](#) sind die theoretisch berechneten pK-Werte mit den apparenten pKa- und pKb- sowie den aus der Simulation im MKM erhaltenen pKi- und pKo-Werten für alle drei *E.coli* Transporter gegenübergestellt.

**Tabelle 31: Gegenüberstellung der experimentell ermittelten apparenten (exp.), im MKM simulierten (sim.) sowie auf Basis der 3D-Strukturen theoretisch berechneten (theor.) pK-Werte für die Protonenbindung und die Protonenfreisetzung.** Die jeweils miteinander korrelierenden simulierten und theoretischen pK-Werte sind rot hervorgehoben. Die experimentell bestimmten ([Seite 103, Tabelle 19](#)) sowie simulierten ([Seite 139, Tabelle 26](#)) pK-Werte sind den entsprechenden Tabellen im Ergebnisteil entnommen.

Transp.	AS	pK-Wert der Protonenbindung			pK-Wert der Protonenfreisetzung		
		exp. pKb	sim. pKo	theor. pKo	exp. pKa	sim. pKi	theor. pKi
LacY	H322	10,9	<b>9,7</b>	<b>9,8</b>	7,5 ± 0,2	<b>7,6</b>	<b>7,2</b>
	E325			5,4			5,8
XylE	D27	10,6 ± 0,1	<b>8,6</b>	<b>9,2</b>	4,6 ± 0,2	<b>4,7</b>	<b>5,0</b>
	E206	7,7 ± 0,2		7,3			
FucP	D46	9,4 ± 0,1	<b>7,4</b>	<b>7,7</b>	6,3 ± 0,2	<b>6,4</b>	<b>6,0</b>
	N42						

### **LacY**

Die pK-Kalkulationen für LacY zeigen, dass die pK-Verschiebung auf einer elektrostatischen Wechselwirkung zwischen E325 und H322 basiert. In der einwärtsgerichteten, substratfreien Struktur (2CFQ) zeigen die nicht-interagierenden Reste E325 und H322 pKa-Werte von 8,8 bzw. 3,3. Diese Konformation entspricht dem einwärtsgerichteten Grundzustand von LacY.

Die δNH-Gruppe des H322 bildet hier eine Wasserstoffbrücke mit Y236, während die εNH-Gruppe frei ist. Im Zucker-gebundenen Zustand (4OAA) ist die εNH-Gruppe von H322 Wasserstoffbrückendonator für die C3OH-Gruppe des Galaktopyranosids [\[135\]](#). Beide Wechselwirkungen (δNH-Y236 und εNH-Zucker) können jedoch nicht zur selben Zeit existieren. Es wird eine Rotation des Imidazols von etwa 30° benötigt, um zwischen diesen Zuständen zu wechseln. Interessanterweise kann E325 im protonierten Zustand als Wasserstoffbrückendonator für die δNH-Gruppe von H322 fungieren und damit den Zuckergebundenen Zustand (εNH-Zucker) stabilisieren. Dieser Mechanismus könnte von zentraler Bedeutung für die Flusskopplung im Symport-Modus von LacY sein, wie auf [Seite 197f](#) ausgeführt.

Im Zucker-gebundenen Zustand, wenn der Imidazol-Rest um 30° gegenüber dem Grundzustand rotiert ist, haben die Aminosäuren E325 und H322 pKa-Werte von 5,8 bzw. 6,5. Nach Entfernen des Zuckers aus der Struktur liegen die pKa-Werte bei 5,8 bzw. 7,2, da H322 nun Kontakt mit Wasser

innerhalb der hydrophilen Kavität aufnehmen kann. Diese pK-Werte entsprechen sehr wahrscheinlich denen während der Protonenfreisetzungsreaktion nach der Zuckerfreisetzung. Nach Anpassung der Konformation durch Energieminimierung ändern sich die pKa-Werte weiter zu 5,4 bzw. 9,8. Diese pK-Werte entsprechen sehr wahrscheinlich denen der Protonenbindungsreaktion nach der Konformationsänderung des leeren Carriers. Die Ursache für die pK-Verschiebung ist wieder eine Rotation des Imidazolrings (*Abbildung 64a*). Die Übereinstimmung zwischen den pK-Werten von H322 und den im kinetischen Modell simulierten pK-Werten zeigt, dass Protonierung und Deprotonierung sehr wahrscheinlich über H322 erfolgen (*Tabelle 31*). Aufgrund lokaler Konformationsänderungen sind die pK-Werte bei Protonenfreisetzung und Protonenbindung unterschiedlich.

### ***XylE***

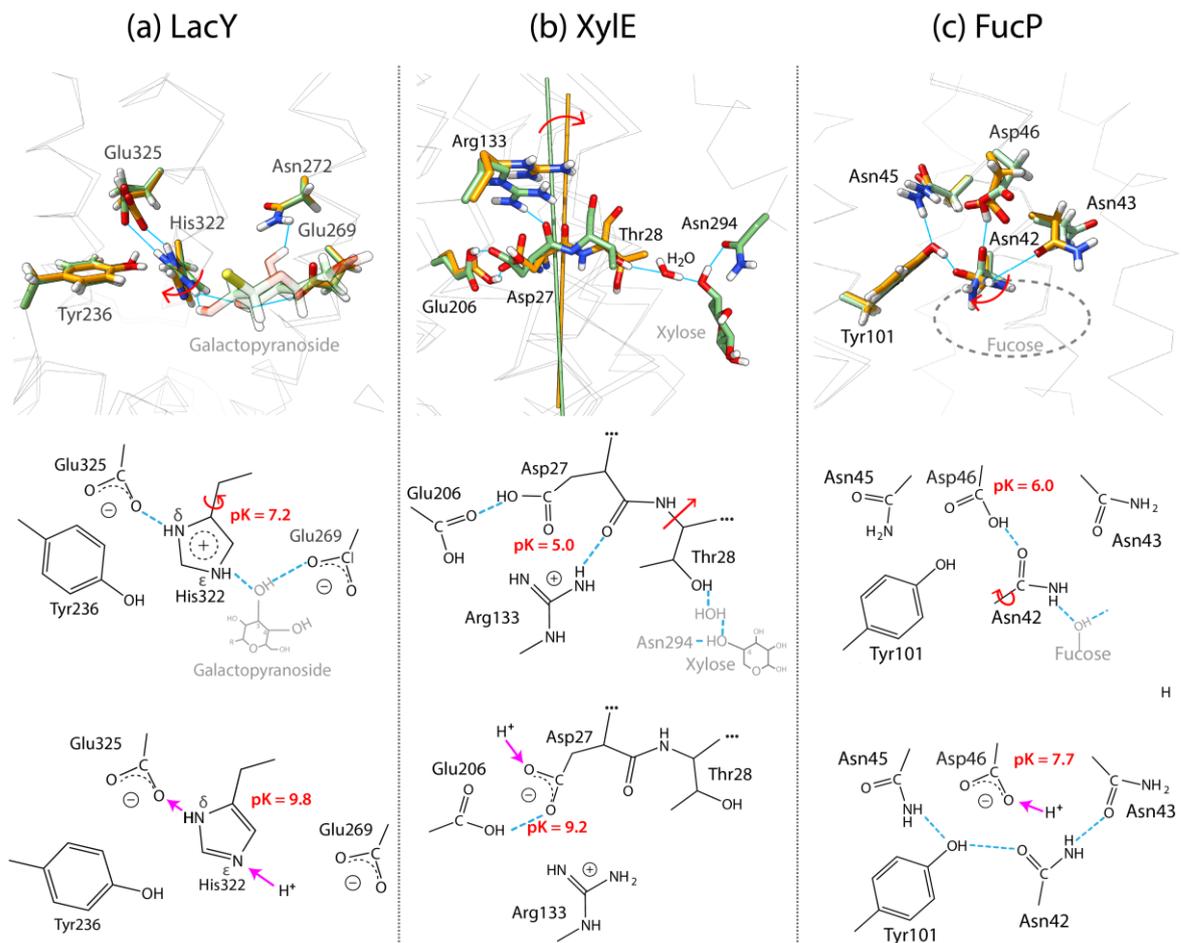
Für XylE lassen sich äquivalente Betrachtungen anstellen. In der Substrat-gebundenen Struktur (4GBY) interagiert D27 elektrostatisch mit R133 und E206. Stark elektrostatisch wechselwirkende Reste können extreme Protonierungszustände zur Folge haben [303, 304]. Es ergeben sich pK-Werte von 9,2 und 7,3 für D27 bzw. E206. Die Interaktion zwischen D27 und E206 ist stark abhängig von der Anwesenheit gebundener Xylose: Nach Entfernen des Zuckers aus der Struktur relaxiert die Nachbarschaft von D27 in einen anderen Zustand und die pK-Werte beider Aminosäurereste liegen dann bei 7,7. Die Substrat-freie XylE Struktur (4QIQ) bestätigt, dass sich in Abwesenheit des Substrats der periplasmatische Teil der Helix-I von Helix-VI weg bewegt und den Winkel zwischen den Helices öffnet (*Abbildung 64b*). Die pK-Werte für D27 und E206 sind in dieser Konformation 5,0 bzw. > 10,5. Die erhaltenen pK-Werte für D27 stimmen sehr gut mit den simulierten pK<sub>i</sub>- und pK<sub>o</sub>-Werten überein (*Tabelle 31*). Das Proton dissoziiert demnach sehr wahrscheinlich direkt von D27 nach der Xylose-Freisetzung.

### ***FucP***

Auf Basis der einzigen verfügbaren FucP Struktur (3O7Q), die ein Molekül  $\beta$ -Nonylglucosid zwischen Helix-I und Helix-IV gebunden hat, wurde die Substrat-gebundene und Substrat-freie Konformation emuliert. Dazu wurde die Homologie zu LacY ausgenutzt. In FucP ist die Protonenbindestelle D46 funktional äquivalent zu E325 in LacY [102, 305]. D46 ist genau eine Helix-Windung von N42 entfernt, in derselben relativen Position wie H322 zu E325 in LacY. Zudem interagiert N42 über eine Wasserstoffbrücke mit der Hydroxylgruppe von Y101, auf dieselbe Weise wie H322 mit Y236 wechselwirkt, wenn der Zucker nicht gebunden ist (2CFQ). Analog zu LacY, könnte die Zuckerbindung in FucP eine Rotation von N42 induzieren. Das  $\delta$ N von N42 orientiert sich neu, um eine Wasserstoffbrücke mit dem Sauerstoff der Hydroxylgruppe von L-Fucose zu bilden (*Abbildung 64c*). Das Amid- $\delta$ O von N42 orientiert sich in diesem Szenario in Richtung der protonierten Carboxylgruppe

von D46, welche als Wasserstoffbrückendonator fungiert und so den Substrat-gebundenen Zustand stabilisiert. Umgekehrt kann eine negative Ladung an D46 den Zucker-gebundenen Zustand nicht stabilisieren. Dieser Mechanismus ist sehr ähnlich zu dem in LacY, wo H322 im Zucker-gebundenen Zustand sehr wahrscheinlich durch die Wasserstoffbrücke zum protonierten E325 stabilisiert wird.

Für D46 in FucP ergeben sich in den entsprechenden Konformationen pK-Werte von 6,0 für den Zucker-freien Zustand und 7,7 für den Zucker-gebundenen Zustand. Beide pK-Werte stimmen sehr gut mit den simulierten pKi- und pKo-Werten überein (Tabelle 31).



**Abbildung 64: Interaktionen in der Umgebung der Zucker- und Protonen-Bindestelle in LacY, FucP und Xyle.** Oben ist jeweils eine Überlagerung der Strukturen in den Zucker-gebundenen (grün) und den deprotonierten (blau) Zuständen dargestellt. Die Heteroatome sind farbig hervorgehoben: rot für Sauerstoff, blau für Stickstoff, weiß für Wasserstoff und gelb für Schwefel; das C $\alpha$ -Rückgrat der Helices ist in grau angedeutet. Mögliche Wasserstoffbrücken sind als blaue Linien dargestellt. Rote Pfeile deuten Konformationsänderungen zwischen den Zuständen an. (a) LacY. Es wurden die Substrat-gebundene Struktur (4OAA-B) und das hypothetische Modell des deprotonierten Zustands verwendet. (b) Xyle. Es sind die Xylose-gebundene Struktur (4GBY) und der Substrat-freie Transporter (4QIQ) dargestellt. Die Stäbe repräsentieren die Achse von Helix-I der entsprechenden Struktur. (c) FucP. Es sind der auf Basis der Homologie zu LacY konstruierte Substrat-gebundene Zustand und die Struktur (3O7Q) nach Entfernen des  $\beta$ -Nonylglucosids mit nachfolgender Energieminimierung in der Nachbarschaft von N42 dargestellt. Unten sind schematische Repräsentationen der Substrat-gebundenen (mitte) und deprotonierten Zustände (unten) gezeigt. Die Substratmoleküle sind grau dargestellt, da sie für die pK-Kalkulationen aus dem Modell entfernt wurden. Die für die einzelnen Konformationen berechneten pK-Werte sind angegeben. Blaue Linien repräsentieren mögliche Wasserstoffbrücken, die auch in den oben gezeigten Strukturen dargestellt sind. Pinke Pfeile deuten die Protonenbindung an.

## Verschiedene Substrate induzieren unterschiedliche Interaktionsnetzwerke

Die *pre steady-state* Ladungsverschiebung der OE-Mutanten wird als elektrogener *induced fit* des Zuckermoleküls interpretiert (Seite 76, Abbildung 24). Die Ladungsverschiebung unter sättigenden Bedingungen korreliert daher mit dem Zustand des Transporters nach der Zuckerbindung. Unterschiedliche Ladungsverschiebungen (Seite 87, Tabelle 16) deuten demnach auf verschiedene Transporter-Zustände hin. 3D-Strukturen mit verschiedenen Substraten zeigen zwar nur sehr geringe Unterschiede. Diese können aber im Rahmen der Graphen-Theorie quantifiziert werden [306] und sind durchaus signifikant.

Die 3D-Strukturdaten eines Proteins können in einem 2D-Graphen als Aminosäure-Interaktionsnetzwerk dargestellt werden. In diesem Graphen repräsentieren die Knoten einzelne Aminosäuren. Die Größe der Knoten gibt an wieviele Interaktionen die jeweilige Aminosäure eingeht. Diese Repräsentation eignet sich dafür Konformationsänderungen in der 3D-Struktur zu visualisieren und auf ihre statistische Signifikanz hin zu untersuchen, ohne sich auf die Chemie einzelner Aminosäuren zu fokussieren. Die Interaktionsnetzwerke von 3D-Strukturen mit verschiedenen, gebundenen Substraten zeigen im Gegensatz zu den 3D-Strukturen selbst eine signifikante Veränderung.

Diese Unterschiede in den Interaktionsnetzwerken zeigen neben den unterschiedlichen Ladungsverschiebungen, dass verschiedene Substrate einen alternativen Reaktionsweg haben und sich die Energieniveaus der Konformationen des beladenen Carriers stark unterscheiden könnten (Seite 171, Abbildung 56). Die hier präsentierten Rechnungen wurden von Dr. Gregor Madej durchgeführt.

### Methode

Die Kontakt-Listen wurden auf Basis der Analyse entsprechender 3D-Strukturen (PDB-Dateien) in UCSF Chimera generiert [302]. Zwei Atome stehen in Kontakt, wenn ihr Van-der-Waals Radius um 0,4 Å überlappt. Kontakte mit einem Abstand von  $\leq 3$  Bindungen wurden verworfen. Das Netzwerk wird repräsentiert durch eine Nachbarschafts-Matrix, in der die Elemente der Matrix zeigen, ob zwei Atome in Kontakt stehen, also benachbart sind, oder nicht.

Mithilfe des lokal laufenden Gephi Scripts (0.8.2b und 0.9.1) [307] werden die mathematischen Strukturen generiert, um die paarweisen Beziehungen zwischen den Seitenketten der entsprechenden Proteinstrukturen zu modellieren. Die Kontakt-Graphen werden als Netzwerk mit N Knoten berechnet und durch eine N x N binäre Matrix  $A = \{a_{ij}\}$  [308], der Nachbarschafts-Matrix

repräsentiert. Das Element der Matrix  $a_{ij}$  ( $i, j = 1, 2, \dots, N$ ) ist gleich 1, wenn ein Kontakt zwischen den Knoten  $i$  und  $j$  vorhanden ist. Ist der Kontakt nicht vorhanden, ist  $a_{ij} = 0$ .

Der Grad  $k_i$  eines Knotens  $i$  ist definiert als die Anzahl der Kontakte ausgehend vom Knoten  $i$ . Die Verteilung der Grade (***degree of distribution***) ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein bestimmter Knoten  $k$  Kontakte zu anderen benachbarten Knoten aufweist. Der gewichtete Grad berücksichtigt den Verknüpfungsgrad der benachbarten Knoten. Er entspricht der Anzahl der Kontakte des Knotens, gewichtet durch die Summe der Kontakte benachbarter Knoten.

Die Zentralität (***betweenness centrality***) eines Knotens ist gleich der Summe der kürzesten Wege, die beliebige Knoten (Seitenketten) über den entsprechenden Knoten (Seitenkette) miteinander verknüpfen. Ein Knoten mit einer hohen Zentralität hat einen großen Einfluss auf den Transfer von Kräften innerhalb eines Netzwerkes. Die Zentralität ist daher ein Indikator für die Wichtigkeit des Knotens in dem Netzwerk.

Die Modularität (***modularity***) wird verwendet, um das Netzwerk in einzelne Module zerlegen zu können. Ein Satz von Knoten lässt sich zu einem Modul zusammenfassen, wenn er mit mehr Knoten innerhalb des Moduls interagiert als mit Knoten außerhalb des Moduls. Damit misst die Modularität die Struktur des Netzwerkes oder genauer gesagt die Dichte der Kontakte innerhalb einer Gruppe von Knoten (eines Moduls) im Vergleich zu den Kontakten zwischen allen Knoten des Netzwerkes [309, 310].

## Ergebnisse

### ***Parameter des LacY-Interaktionsnetzwerks korrelieren mit experimentellen Ergebnissen***

Die Ergebnisse der Analyse des Interaktionsnetzwerks für LacY (PDB-ID 2V8N) sind kompatibel mit experimentellen Daten. So lässt sich das Interaktionsnetzwerk in 12 Module unterteilen, die nicht mit den 12 Helices des Transporters korrelieren. Die Module korrelieren jedoch mit den strukturellen Segmenten, die in Einzelmolekül-Kraft-Spektroskopie-Experimenten (smAFM) gefunden wurden. Im smAFM-Experiment konnten jedoch nur 10 strukturelle Segmente aufgelöst werden [158].

Die Zentralität einer Seitenkette ist stark von der Konformation des Transporters abhängig. In jeder Konformation des Transporters sind andere Aminosäuren von Bedeutung, um Kräfte im Netzwerk zu transferieren. Damit sind in unterschiedlichen Konformationen andere Proteinsegmente miteinander verknüpft. Diese Beobachtungen sind mit den Ergebnissen aus *Crosslinking*-Experimenten kompatibel: Viele *Crosslinks* verhindern den Symport in LacY [156, 157]. Seitenketten mit hoher Zentralität liegen meist im Bereich der zentralen Kavität von LacY, mit der Ausnahme von wenigen Resten wie E325, R302 und K319.

Es ist anzumerken, dass Aminosäuren mit einer hohen Zentralität nur schwach mit den Seitenketten korrelieren, die nach Cystein-*Scanning* Mutagenese eine geringere Transportaktivität bewirken [311]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Bedeutung einer Aminosäure für die lokale Struktur nicht notwendigerweise auch eine Bedeutung für den Transportprozess haben muss. Umgekehrt ist für den Transport möglicherweise die Chemie einzelner Aminosäuren wichtiger als die lokale Konformation der Umgebung.

### ***Der Einfluss des Substrats auf das Interaktionsnetzwerk***

Die Bindung eines Galaktopyranosids an LacY induziert größere Konformationsänderungen gemäß des *Alternating Access* [147]. Darüber hinaus zeigt das Interaktionsnetzwerk auch Änderungen in der Feinstruktur: Das gebundene Substrat hat Einfluss auf die Modularität der Proteinsegmente und die Zentralität einzelner Aminosäuren (*Abbildung 65a*). Die Verteilung des gewichteten Verknüpfungsgrades folgt einer Gauß-Verteilung und zeigt durchschnittliche Werte von 16 bis 20 Verknüpfungen pro Knoten (*Abbildung 65b*). In 3D-Strukturen mit gebundenen sekundären Substraten (LacY mit TDG, PDB-ID 4OAA; XylE mit D-Glucose, PDB-ID 4GBZ) ist die Verteilung des gewichteten Verknüpfungsgrades zu größeren Werten hin verschoben. Auch die Module des Interaktionsnetzwerks und die Zentralität einzelner Aminosäuren augenscheinlich gleicher Konformationen mit verschiedenen Substraten unterscheiden sich signifikant voneinander. Diese Beobachtungen für sich zeigen, dass das gebundene Substrat den Zustand des Transporters erheblich beeinflusst. Dies korreliert mit der Beobachtung, dass Substrate wie TDG und D-Glucose signifikant andere *pre steady-state* Ladungsverschiebungen in LacY und XylE induzieren als deren Hauptsubstrate (*Seite 87, Tabelle 16*).

Interessanterweise beeinflusst das Hauptsubstrat D-Xylose in XylE (PDB-ID 4GBY) das Interaktionsnetzwerk im Vergleich zum Transporter ohne gebundenem Substrat (apo XylE, PDB-ID 4QIQ) kaum (*Abbildung 65b, rechts*). Die für die Berechnung des Interaktionsnetzwerkes verwendeten 3D-Strukturen entsprechen den Substrat-okkludierten auswärtsgerichteten Konformationen und den Substrat-freien einwärtsgerichteten Konformationen. Dies zeigt, dass die globale Konformation weniger Einfluss auf das Interaktionsnetzwerk hat, als das gebundene Substrat. Substrate induzieren unterschiedliche Transporter-Zustände bezüglich der Feinstruktur, die im Interaktionsnetzwerk zu erkennen sind. Globale Konformationsänderungen führen zu unterschiedlichen Konformationen, die im Interaktionsnetzwerk nicht aufgelöst werden. Die Transporter zeigen also ein dynamisches Verhalten auf mehreren Strukturebenen. Die Diskussion über *rocker switch* und *flexible gates* im Rahmen des *Alternating Access* ist um Substrat-induzierte Feinstrukturänderungen zu erweitern.

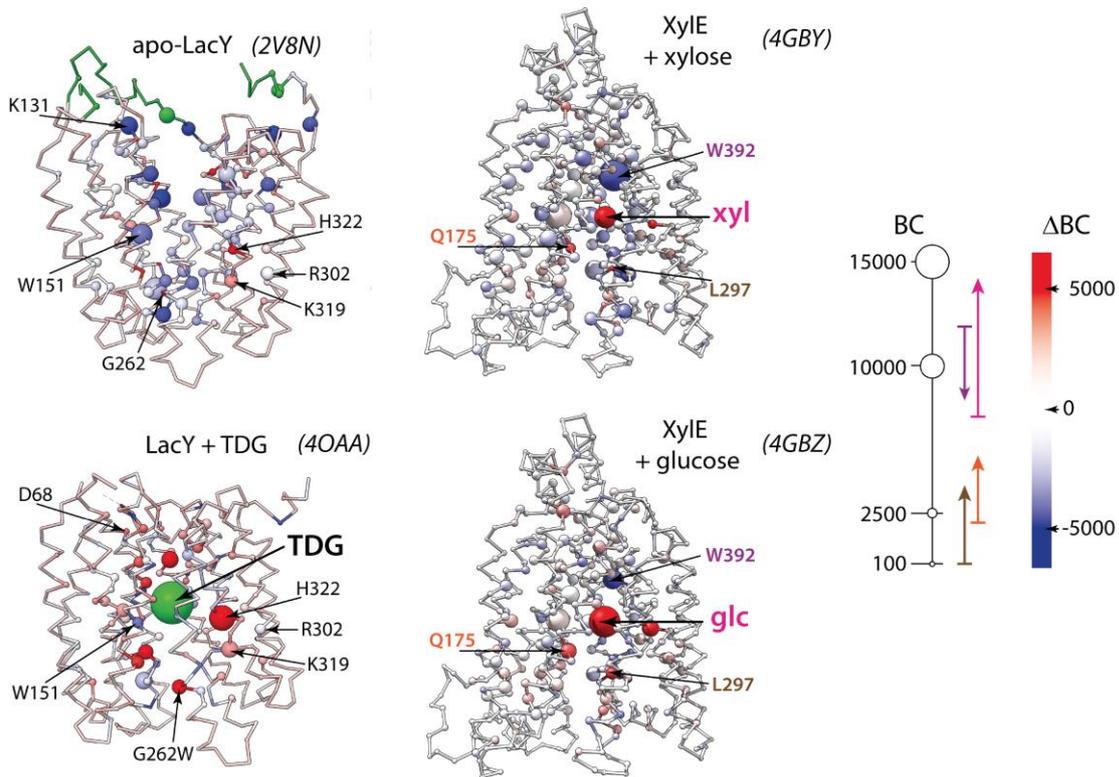
Im Gegensatz zu D-Xylose (PDB-ID 4GBY) dominiert D-Glucose (PDB-ID 4GBZ) das Interaktionsnetzwerk in der Glucose-gebundenen Struktur (*Abbildung 65a, rechts*). D-Glucose hat im Vergleich zu D-Xylose eine wesentlich größere Zentralität. Visualisiert ist dies durch die Größe des Substrat-Knotens in der entsprechenden Abbildung. Dasselbe gilt für TDG in der entsprechenden LacY-Struktur (*Abbildung 65a, links*). Gleichzeitig wird die Verteilung des gewichteten Verknüpfungsgrades im Interaktionsnetzwerk durch D-Glucose und TDG zu höheren Werten verschoben (*Abbildung 65b*). Dies ist gleichbedeutend mit einer Erhöhung der intramolekularen Interaktionen im Transporter und einer rigideren Struktur. Sehr wahrscheinlich ist dies verbunden mit einer reduzierten Energie des okkludierten Zustandes und einer gleichzeitigen Erhöhung der Energiebarrieren für den Zerfall des okkludierten Zustands (*Seite 171, Abbildung 56, grüne Kurve*). Klingenberg et al. beschreibt, dass der Inhibitor eines Transporters mehr Kontakte zu dem Transporter ausbildet als das Substrat. Dadurch würde der Transporter in einer Energiefalle gefangen [286]. Sekundäre Substrate, die mit einer geringen Umsatzrate transportiert werden (TDG) oder ausschließlich an den Transporter binden (D-Glucose), könnten damit als Inhibitoren nach Klingenberg et al. interpretiert werden. So könnte das Energieniveau der stabilen Konformationen wie die des okkludierten Zustands herabgesetzt sein, während die Energien der Übergangszustände relativ dazu erhöht sind. Eine nähere Betrachtung der Konsequenzen auf die Energieniveaus der Transporter-Zustände findet sich in *Abbildung 56 (Seite 171)*. Für sekundäre Substrate in LacY und XylE ist auch eine erhöhte Affinität gefunden worden (*Seite 85, Tabelle 15*), was mit der Herabsetzung der Energieniveaus der Transporter-Zustände übereinstimmt.

### ***Eine Betrachtung von Q175 und L297 in XylE***

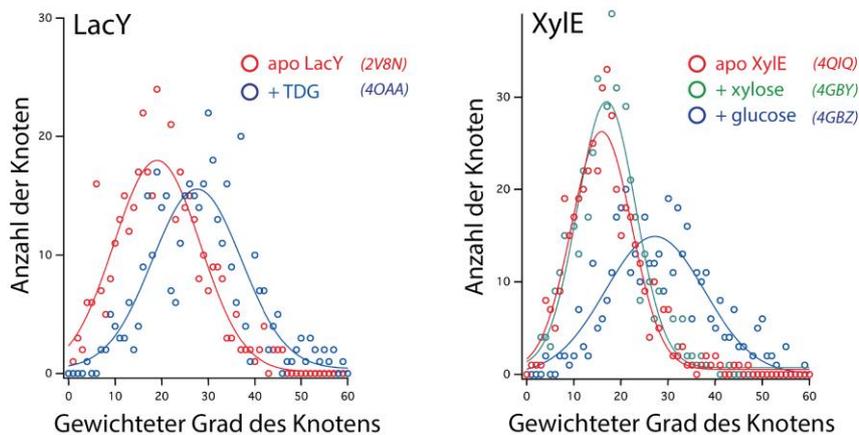
Wt XylE katalysiert keinen Transport von D-Glucose (*Seite 78, Abbildung 25*), während Q175I/L297F XylE D-Glucose transportiert [144]. Auch im SSM-Experiment können für Q175I/L297F XylE mit D-Glucose niedrige, stationäre Ströme erhalten werden (*Seite 132, Abbildung 49*).

Der Unterschied zwischen D-Glucose- und D-Xylose-induzierter XylE-Aktivität lässt sich möglicherweise strukturell erklären. Die Struktur von XylE mit gebundener D-Glucose zeigt im Gegensatz zur Struktur mit D-Xylose zusätzliche Kontakte der C6OH-Gruppe mit Q175 und der C1OH-Gruppe mit G388 [132]. Die Aminosäuren Q175 und L297 zeigen mit gebundener D-Glucose Veränderungen in der Zentralität von 267 % und 2733 % gegenüber der Struktur mit gebundener D-Xylose. Eine signifikante Veränderung der Zentralität mit entgegengesetzter Polarität wird auch für den Substrat-Liganden W392 gefunden. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Bindung von D-Glucose eine Transporter-Konformation induziert, in der die Substrat-Liganden auf andere Weise involviert sind wie in der D-Xylose-induzierten Transporter-Konformation. D-Glucose könnte somit einen okkludierten Zustand mit den falschen Seitenketten induzieren.

## (a) Einfluss des Substrats auf die Zentralität einzelner Aminosäuren



## (b) Einfluss des Substrats auf die Verteilung des gewichteten Verknüpfungsgrades

**Abbildung 65: Einfluss der Substrate auf das Interaktionsnetzwerk in den 3D-Strukturen von LacY und XyleE.**

(a) Darstellung der 3D-Strukturen von XyleE und LacY mit verschiedenen gebundenen Substraten. Die entsprechenden PDB-IDs sind angegeben. Jeder Knoten repräsentiert eine Aminosäure. Die Größe der Knoten ist ein Maß für die Zentralität des Knotens. Der Farbcodiert ist ein Maß für die Änderung der Zentralität des jeweiligen Knotens im Vergleich zur anderen Struktur desselben Transporters. Die absoluten Werte für die Zentralität (BC und  $\Delta BC$ ) sind in der Legende angegeben. Es ist zu erkennen, dass die sekundären Substrate D-Glucose und TDG das Interaktionsnetzwerk mit hohen BC-Werten dominieren. (b) Verteilung des gewichteten Verknüpfungsgrades aller Knoten im Interaktionsnetzwerk verschiedener 3D-Strukturen. Sekundäre Substrate (TDG in LacY und D-Glucose in XyleE; blaue Kurve) bewirken eine Verschiebung der Verteilung zu höheren Werten im Vergleich zur Substratfreien Struktur (rote Kurven) und zur Struktur gebunden an das Hauptsubstrat (D-Xylose, grüne Kurve). Die Verschiebung zu höheren Werten entspricht einer Struktur mit mehr Interaktionen, also einer rigideren Konformation. Darüber hinaus zeigt sie ganz allgemein, dass die Struktur des Transporters stark vom Substrat beeinflusst wird, was die verschiedenen *pre steady-state* Ladungsverschiebungen von D-Glucose und D-Xylose in XyleE sowie D-Lactose und TDG in LacY erklären könnte (Seite 87, Tabelle 16).

Wie oben beschrieben zeigt die Verteilung des gewichteten Verknüpfungsgrades für D-Glucose eine Verschiebung zu höheren Werten ([Abbildung 65b](#)), was den Transporter in dem Energieminimum der Substrat-okkludierten Struktur gefangen halten könnte. Dieses Energieminimum müsste wesentlich stärker ausgeprägt sein als die grüne Kurve in [Abbildung 56 \(Seite 171\)](#) für andere sekundäre Substrate andeutet. Für die Verschiebung der Verteilung des gewichteten Verknüpfungsgrades könnten auf Basis der hohen Zentralität in der D-Glucose-induzierten Transporter-Konformation die Aminosäuren Q175 und L297 verantwortlich gemacht werden. Die Mutation dieser beiden Reste verhindern möglicherweise diese Interaktionen [\[144\]](#) und stellen somit den Konformationsraum wieder her, der für den Transportvorgang benötigt wird. Dies ist auch damit kompatibel, dass D-Glucose in Q175I/L297F XylE ähnliche *pre steady-state* Ladungsverschiebungen induziert wie D-Xylose in wt XylE ([Seite 132, Abbildung 49](#)).

## Messungen an D46N FucP

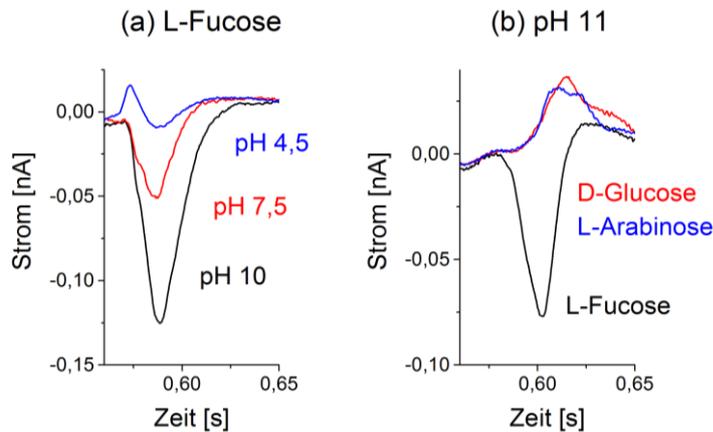
In wt FucP sind im basischen pH-Bereich schnelle transiente Ströme zu erkennen ([Seite 106, Abbildung 36e](#)), die den *pre steady-state* Signalen der übrigen Transporter ähneln, aber eine signifikant geringere Elektrogenität aufweisen.

Elektrophysiologische Messungen an D46N FucP zeigen ebenso schnelle transiente Ströme, die signifikant kleiner sind, als die transienten Ströme der übrigen Mutanten (E325A LacY, D27N XylE, D22N GlcP), die dem *induced fit* des Zuckermoleküls zugeordnet wurden ([Seite 108, Abbildung 37; Seite 119, Abbildung 42](#)). Sie liegen im sauren und neutralen pH-Bereich am Rande der Detektionsgrenze (< 50 pA) und bei basischen pH-Werten etwas höher ([Abbildung 66a](#)). So ergibt sich bei pH 11 ein mittlerer Peakstrom von  $-80 \pm 30$  pA. Damit steigt die Elektrogenität dieses Signals im basischen an, so wie auch in wt FucP beobachtet.

Konzentrationssprünge mit L-Fucose bei verschiedenen pH-Werten auf der SSM ohne angelagerte Proteoliposomen zeigen hingegen lediglich Peakströme zwischen 0 pA und +20 pA ([Daten nicht gezeigt](#)). Auch Konzentrationssprünge mit den Nichtsubstraten D-Glucose und L-Arabinose bei pH 11 ergeben niedrige, positive Peakströme ([Abbildung 66b](#)). Beides sind Hinweise darauf, dass es sich bei den schnellen L-Fucose-induzierten Strömen an D46N FucP tatsächlich um Transporter-spezifische *pre steady-state* Signale handelt.

Anzumerken ist, dass die L-Fucose-induzierten Peakströme in D46N FucP ein negatives Vorzeichen aufweisen, wogegen die L-Fucose-induzierten, schnellen transienten Ströme in wt FucP bei basischen pH-Werten ein positives Vorzeichen haben. Dass es sich in beiden Fällen um dieselbe *pre steady-state* Reaktion handelt, erscheint aus diesem Grund zunächst nicht plausibel. Ein Vergleich zwischen

den *pre steady-state* Ladungsverschiebungen der übrigen wt Transporter und Mutanten zeigt jedoch, dass die absoluten Werte durchaus durch die Mutation verändert werden können ([Seite 107, Tabelle 20](#)). Bei niedrigen absoluten Stromwerten wie in FucP könnte durch die Mutation durchaus auch eine Vorzeichenumkehr resultieren, wenn die Konformationsänderungen während des *induced fits* durch die Mutation der Protonenbindestelle beeinflusst wird.

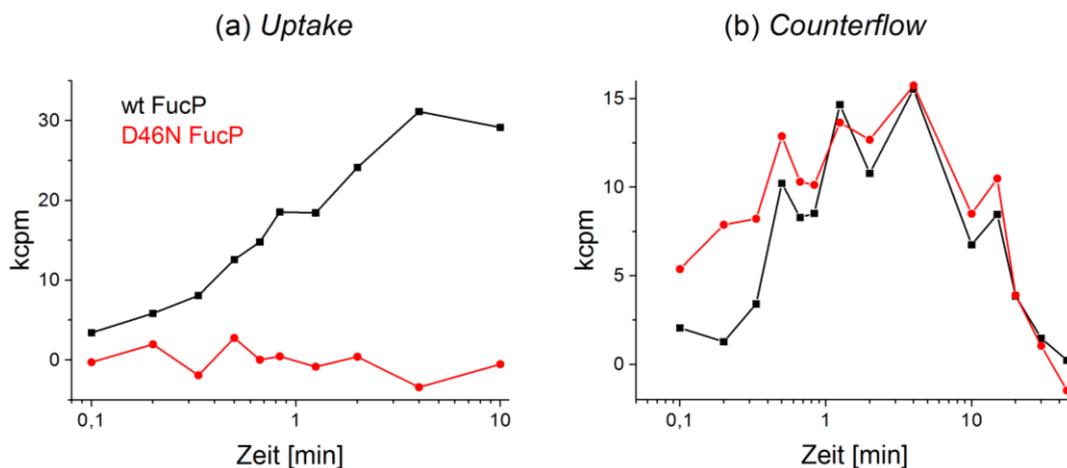


**Abbildung 66: Zucker-induzierte schnelle transiente Ströme in D46N FucP.** (a) Exemplarische pH-Abhängigkeit der L-Fucose-induzierten transienten Ströme. Bei basischen pH-Werten nimmt die Elektrogenität des Signals zu. (b) Exemplarische Substrat-Abhängigkeit der Zucker-induzierten transienten Ströme bei pH 11. Das L-Fucose-induzierte Signal unterscheidet sich signifikant von den Artefakten, die durch die Nichtsubstrate D-Glucose und L-Arabinose induziert werden.

Um Fehler während der Proben-Präparation von D46N FucP auszuschließen, wurden Transportassays mit radioaktiv markierter L-Fucose durchgeführt. Dazu wurden die für die SSM präparierten Proteoliposomen verwendet und mit präformierten Liposomen so verdünnt, dass die LPR von 5 auf 200 erhöht wurde. Um eine homogene Probe zu erhalten wurden fünf *Freeze-Thaw-Sonicate* Zyklen durchgeführt. Die genaue Vorgehensweise ist auf [Seite 73f](#) beschrieben. In einem Potentialgetriebenen *Uptake* Assay zeigt D46N FucP im Gegensatz zum Wildtyp keine Akkumulierung von L-Fucose ([Abbildung 67a](#)). Im *Counterflow* Experiment ist zu erkennen, dass D46N FucP Fucose-Austausch katalysiert, sogar schneller als wt FucP ([Abbildung 67b](#)). Das Protein für die elektrophysiologischen Messungen ist damit funktional und die Aktivität von D46N FucP mit der Aktivität der OE-Mutanten von LacY, XylE und GlcP vergleichbar. Zusammenfassend handelt es sich bei den schnellen transienten Strömen in wt FucP im basischen pH-Bereich ([Seite 106, Abbildung 36](#)) sehr wahrscheinlich auch um ein Zuckerbindungs-induziertes *pre steady-state* Signal, wie es für die OE-Mutanten von LacY, XylE und GlcP beobachtet wird. Die Elektrogenität dieses Signals ist jedoch im neutralen pH-Bereich am Rande der Detektionsgrenze und wird erst bei basischen pH-Werten sichtbar.

Es ist anzumerken, dass im *Counterflow*-Experiment nach etwa 10 Minuten Zucker-Efflux zu beobachten ist, der für wt und OE-Mutante in etwa gleich schnell erfolgt. Eine Efflux-Aktivität lässt

sich im MKM nur mit einer hohen effektiven Rate der Konformationsänderung im leeren Carrier realisieren. Da D46N FucP als permanent protonierter wt Carrier betrachtet werden kann, deutet dies darauf hin, dass die Konformationsänderung im protonierten Carrier (PH) in etwa so schnell stattfindet wie die Konformationsänderung im leeren Carrier (P). Analoge Beobachtungen wurden auch für andere Transporter gemacht, wie im Detail in der Diskussion auf [Seite 153f](#) beschrieben ist. Aus diesem Grund wird die Konformationsänderung in PH auch im 8-Zustands-Modell berücksichtigt ([Seite 150, Abbildung 54](#)). In den OE-Mutanten anderer Transporter ist die Efflux-Rate jedoch im Vergleich zum jeweiligen wt vermindert. *Counterflow*-Messungen mit D22N GlcP zeigen erst nach etwa 60 Minuten Efflux-Aktivität [133]. Efflux-Messungen in E325A LacY zeigen etwa 1/6 der Efflux-Aktivität von wt LacY, obwohl im *Counterflow* Experiment mit E325A LacY nach 10 Minuten noch keine Efflux-Aktivität zu erkennen ist [80]. Möglicherweise ist die Ratenkonstante der Konformationsänderung des protonierten Carriers, welche die Umsatzrate im Efflux-Modus der OE-Mutanten limitiert, in FucP signifikant höher als die der übrigen Transporter. Möglicherweise deutet dies auf eine wesentlich schwächere Kopplung zwischen Protonen- und Zuckertranslokation in FucP hin.



**Abbildung 67: Radioaktive Transportassays an D46N und wt FucP.** Gezeigt ist jeweils ein exemplarischer Datensatz aus drei Messreihen. Die entsprechenden Datensätze der Negativkontrolle (Liposomen) wurden von den Datensätzen der Proteoliposomen subtrahiert. (a) *Uptake*-Experiment mit  $pH_o = 5,5$ ,  $c_{so} = 0,17 \mu M$   $^{14}C$  L-Fucose und  $pH_i = 7,6$ . (b) *Counterflow*-Experiment mit  $pH_o = 7,6$ ,  $c_{so} = 0,17 \mu M$   $^{14}C$  L-Fucose und  $pH_i = 7,6$ ,  $c_{si} = 10$  mM L-Fucose.

## Elektrophysiologische Charakterisierung von I172A Xyle

Die Aminosäure I172 in Xyle befindet sich in der Nähe der C6OH-Gruppe gebundener D-Glucose [266] und könnte potentiell über Van-der-Waals-Wechselwirkungen den im Vergleich zu D-Xylose niedrigeren KM-Wert für D-Glucose vermitteln ([Seite 85, Tabelle 15](#)). Eine Mutation könnte damit Einfluss auf die Affinität von D-Glucose haben. Die Mutation I172A verändert sehr wahrscheinlich aber auch die Struktur der Zucker-Bindetasche und kann so möglicherweise auch indirekt die Bindung von D-Glucose und D-Xylose beeinflussen.

Sowohl D-Xylose als auch D-Glucose induzieren im pH-Bereich zwischen 4,5 und 9,0 langsame transiente Ströme mit relativ hohen Abklingzeiten aber niedriger Elektrogenität (*Abbildung 68*). Damit unterscheiden sich die Ströme maßgeblich sowohl von denen des Wildtyps als auch von denen der OE-Mutante D27N XylE. Die Wildtyp-Signale zeigen eine wesentlich größere Elektrogenität, während die Signale von D27N XylE wesentlich niedrigeren Abklingzeiten aufweisen (*Tabelle 32*). Im Gegensatz zum wt und zu D27N XylE induzieren sowohl D-Glucose als auch D-Xylose in I172A XylE ähnliche Ströme, die sich im Peakstrom wenig unterscheiden.

Da die Mutation sehr wahrscheinlich Einfluss auf die Struktur der Bindetasche hat, könnte das Signal als stark veränderter *induced fit* interpretiert werden. Die Veränderung der Bindetasche beeinträchtigt die Bindung oder den *induced fit* in seiner Ratenkonstante und hat weiterhin Einfluss auf die Gesamtladungsverschiebung während des *induced fits*.

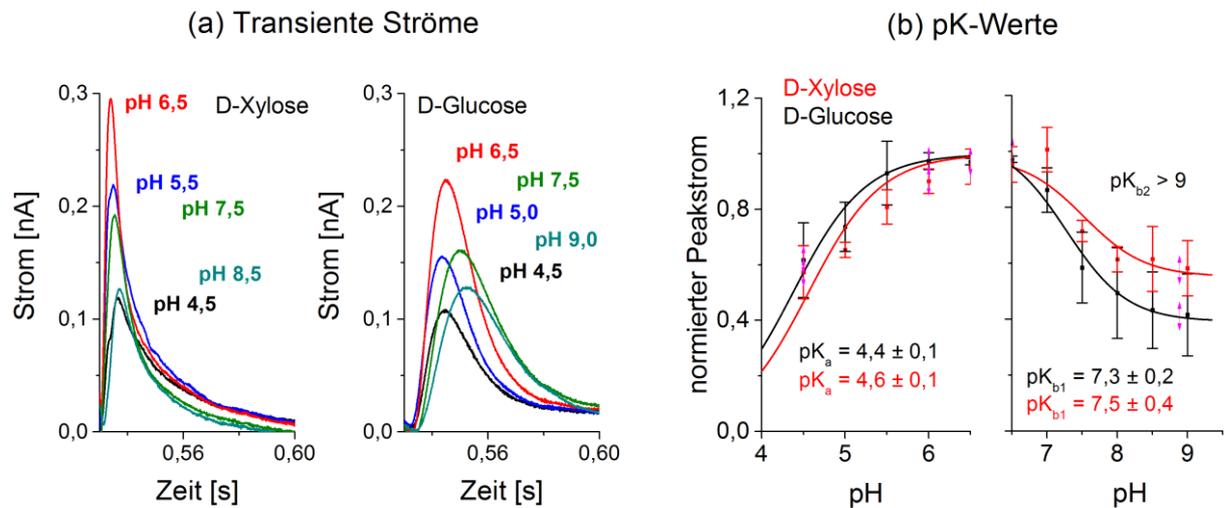
Die pH-Abhängigkeit D-Xylose-induzierter Signale stimmt jedoch mit der des wt überein (*Seite 102, Abbildung 34*), was auf *steady-state* Signale hinweist. Genauso entspricht die pH-Abhängigkeit D-Glucose induzierter Signale der von Q175I/L297F XylE, die stationären Transport von D-Glucose katalysiert (*Seite 132, Abbildung 49*). Die pH-Abhängigkeiten weisen demnach auf Signale hin, die mit einem *steady-state* Transport korrelieren könnten.

**Tabelle 32: Experimentell bestimmte Parameter für wt XylE, D27N XylE und I172A XylE (alle LPR 5).** Alle von der Zeitauflösung abhängigen Parameter wurden am schnellen Setup bestimmt. Peakstrom  $I_p$ , Ratenkonstante  $k_{obs}$  und Ladung Q wurden bei pH 7,5 ermittelt. Die Daten für D27N XylE und wt XylE wurden aus dem Ergebnisteil der Arbeit übernommen.

Parameter	D-Xylose			D-Glucose		
	Wt XylE	D27N XylE	I172A XylE	Wt XylE	D27N XylE	I172A XylE
$I_p$	$2,4 \pm 0,7$ nA	$1,03 \pm 0,2$ nA	$0,16 \pm 0,05$ nA	$0,47 \pm 0,1$ nA	$0,21 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,03$ nA
$k_{obs}$	/	$> 300$ s <sup>-1</sup>	$29 \pm 4$ s <sup>-1</sup>	/	$> 300$ s <sup>-1</sup>	$59 \pm 6$ s <sup>-1</sup>
Q	/	$6,8 \pm 1,5$ pC	$13,1 \pm 5,1$ pC	/	$1,1 \pm 0,3$	$5,1 \pm 1,4$ pC
pKa	$4,6 \pm 0,2$	/	$4,6 \pm 0,1$	$4,7 \pm 0,1$	/	$4,4 \pm 0,1$
pKb1	$7,7 \pm 0,2$	/	$7,5 \pm 0,4$	/	/	$7,3 \pm 0,4$
pKb2	$10,6 \pm 0,1$	/	$> 9$	$10,4 \pm 0,1$	/	$> 9$
KM	$1,7 \pm 0,2$ mM	$1 \pm 0,1$ mM	$1 \pm 0,1$ mM	$0,4 \pm 0,1$ mM	$1,9 \pm 0,4$ mM	$1 \pm 0,1$ mM

Insgesamt ähnelt das Verhalten von I172A XylE dem von C154G LacY. In C154G LacY ist ebenfalls die Zuckerbindetasche verändert. Sie ist daher im Gegensatz zu der OE-Mutante stark beeinträchtigt im Lactose-Uptake und -Austausch, bindet aber D-Lactose genauso gut wie wt LacY [138]. Im SSM-Experiment zeigt C154G LacY auch Signale niedriger Elektrogenität und mit ähnlich langsamen Abklingzeiten wie I172A XylE [163]. Es wird angenommen, dass C154G LacY nach dem *induced fit* in

einem okkludierten, Substrat-gebundenen Zustand stabilisiert wird, wodurch die Zuckerfreisetzung erheblich verlangsamt ist.



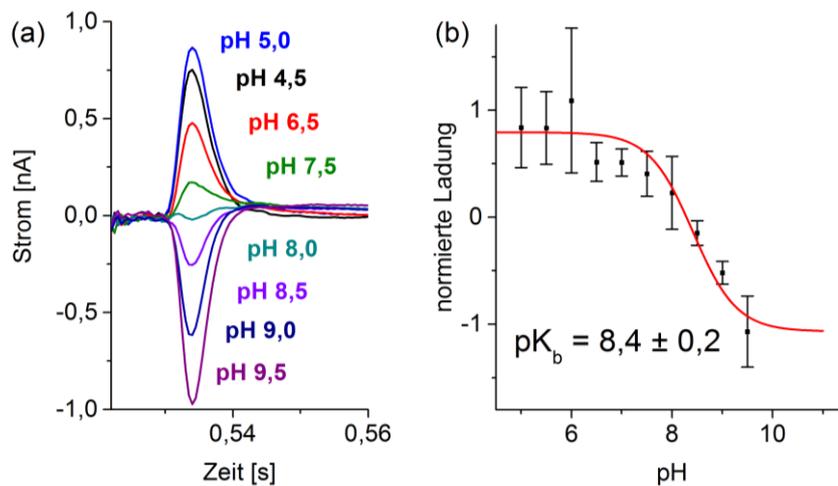
**Abbildung 68:** pH-Abhängigkeit D-Xylose- und D-Glucose-induzierter Signale von I172A XylE. (a) Exemplarische transiente Ströme für verschiedene pH-Werte. (b) Normierte und gemittelte Peakströme und Bestimmung der pK-Werte mit Gleichungen G40 und G42 (Seite 57). Für den Fit der pK<sub>a</sub>-Werte wurden die Peakströme zwischen pH 4,5 und pH 6 verwendet. Für den Fit der pK<sub>b1</sub>-Werte wurden die Peakströme zwischen pH 6,5 und pH 9 verwendet.

## Elektrophysiologische Charakterisierung von I105S GlcP

Im Gegensatz zu den PMF-gekoppelten prokaryotischen Zucker-Transportern, katalysieren die humanen GLUTs Uniport [111, 112]. Es konnten Aminosäurereste identifiziert werden, die für die Uniport-Funktion in GLUTs essentiell sind. Um GlcP in einen Uniporter umzuwandeln, wurden Mutanten entwickelt, welche diese essentiellen Aminosäuren der GLUTs in GlcP einführen. Diese Mutanten sind D22N GlcP und I105S GlcP [133]. D22N GlcP hat analog zu den meisten GLUTs sowie den OE-Mutanten E325A LacY, D46N FucP und D27N XylE die Fähigkeit zur Protonenbindung verloren. Die OE-Mutante katalysiert Zucker-Austausch, aber aufgrund der fehlenden Protonenbindestelle keinen Zucker-Protonen-Symport [133]. Unter anderem die vorhandene Efflux-Aktivität in E325A LacY [80] zeigt, dass der permanent protonierte Carrier die Membran passieren kann und die OE-Mutanten damit Zucker Uniport katalysieren. Die elektrophysiologische Charakterisierung von D22N GlcP erfolgte im Rahmen dieser Arbeit (Seite 119, Abbildung 42). I105S GlcP fungiert als Modell für GLUT2-vermittelten Uniport. In GLUT2 entspricht D27 der in den prokaryotischen Zucker-Transportern vorliegenden negativ geladenen Protonenbindestelle. GLUT2 enthält weiterhin ein Serin (S161), das eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem negativ geladenen Aspartat eingeht. Es wird vermutet, dass dieses Serin durch die Stabilisierung des Protonen-freien D27 den PMF-gekoppelten Zucker-Transport in GLUT2 verhindert [133]. In I105S GlcP wurde an homologer Position das Serin eingeführt, um eine Wasserstoffbrücke mit D22 auszubilden und GlcP in einen Uniporter zu verwandeln.

I105S GlcP zeigt wie wt GlcP unter symmetrischen pH-Bedingungen ausschließlich schnelle *pre steady-state* Signale (Abbildung 69). Mit einem  $pK_b$ -Wert von 8,4 ändert sich die Polarität der Signale vom positiven zum negativen Vorzeichen, sodass wie im wt die Bindung von D-Glucose an den protonierten und an den unprotonierten Carrier beobachtet werden kann (Seite 118, Abbildung 41). Das eingeführte Serin stabilisiert damit nicht wie in der Literatur angenommen den unprotonierten Zustand des Carriers. Im Gegenteil sind die  $pK_b$ -Werte der Zuckerbindung in wt (8,6) und I105S (8,4) GlcP nahezu identisch. Eine Stabilisierung des unprotonierten Carriers würde sich durch einen reduzierten  $pK_b$ -Wert bemerkbar machen. Zudem zeigten bereits die *Counterflow*-Messungen in der Literatur, dass I105S GlcP und wt GlcP ähnliche pH-Abhängigkeiten zeigen [133].

Uniporter dürfen im Gegensatz zu PMF-gekoppelten Symportern keine elektrogenen *steady-state* Signale zeigen. Da sowohl in I105S GlcP als auch in wt GlcP kein elektrogener *steady-state* unter symmetrischen pH-Bedingungen detektiert werden konnte, ist auf Basis der transienten Ströme keine Aussage möglich, ob die Tendenz zum Uniport in I105S GlcP größer als im wt ist oder nicht. Für vergleichende Betrachtungen sind Messungen mit pH-Gradienten notwendig, die in wt GlcP Symport- und Antiport-Aktivitäten induzieren (Seite 124, Abbildung 45). Die Ergebnisse deuten vielmehr darauf hin, dass sowohl in wt als auch in I105S GlcP aufgrund einer nur geringen Kopplung zwischen Protonen- und Zuckertranslokation der Uniport unter symmetrischen pH-Bedingungen dominiert.



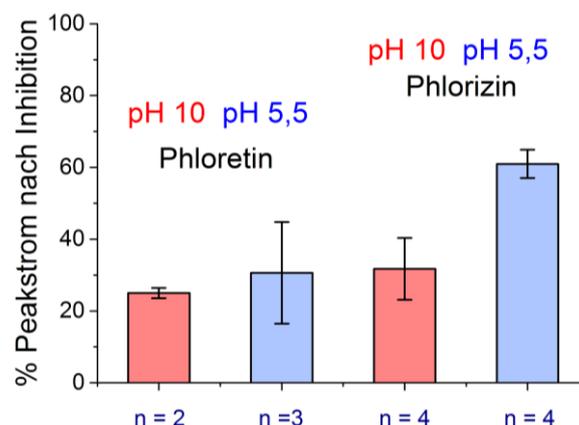
**Abbildung 69: pH-Abhängigkeit D-Glucose-induzierter Signale von I105S GlcP.** (a) Exemplarische transiente Ströme. Die transienten Ströme sind im Gegensatz zu denen von wt GlcP (Seite 118, Abbildung 41) durch die Zeitauflösung des schnellen Setups limitiert. (b) Gemittelte Peakströme und Bestimmung des  $pK$ -Werts mit Gleichung G41 (Seite 57).

Im Unterschied zu wt GlcP sind die Abklingzeiten der transienten Ströme mit positiver und negativer Amplitude identisch, signifikant niedriger als im wt und sehr wahrscheinlich begrenzt durch die Zeitauflösung des Lösungswechsels. Die sich ergebende Ratenkonstante ist mit  $> 300 \text{ s}^{-1}$  als untere Grenze zu betrachten. Wie in wt GlcP handelt es sich bei den zwei Signalen mit unterschiedlichem Vorzeichen auch in I105S GlcP sehr wahrscheinlich um zwei *pre steady-state* Reaktionen

unterschiedlichen Ursprungs (Seite 165, Abbildung 55). Im wt erfolgen der *induced fit* des Zuckermoleküls ( $90 \text{ s}^{-1}$ ), der eine positive Ladung transferiert, sowie der Transfer der negativ geladenen Protonenbindestelle über die Membran bei pH-Werten  $> \text{pKb}$  ( $220 \text{ s}^{-1}$ ) wesentlich langsamer (Seite 107, Tabelle 20). Damit ist der Einfluss der Mutation eine Beschleunigung der elektrogenen Reaktionen im Transportzyklus, nicht aber die Stabilisierung der Protonenbindestelle im unprotonierten Zustand.

## Inhibition von GlcP mit GLUT Inhibitoren

Es wurden die GLUT-Inhibitoren Forskolin, Phloretin und Phlorizin als potentielle Inhibitoren für das *pre steady-state* Signal in GlcP getestet. Sie wurden zu  $10 \mu\text{M}$  in NA- und A-Lösungen zugesetzt. Nach der Inhibition wurden die Messungen ohne Inhibitor wiederholt und die Reversibilität der Inhibition getestet. In den meisten Fällen konnte das ursprüngliche Signal wiederhergestellt werden. Forskolin war eine Ausnahme und bewirkte einen vollständigen und irreversiblen Verlust des Signals.



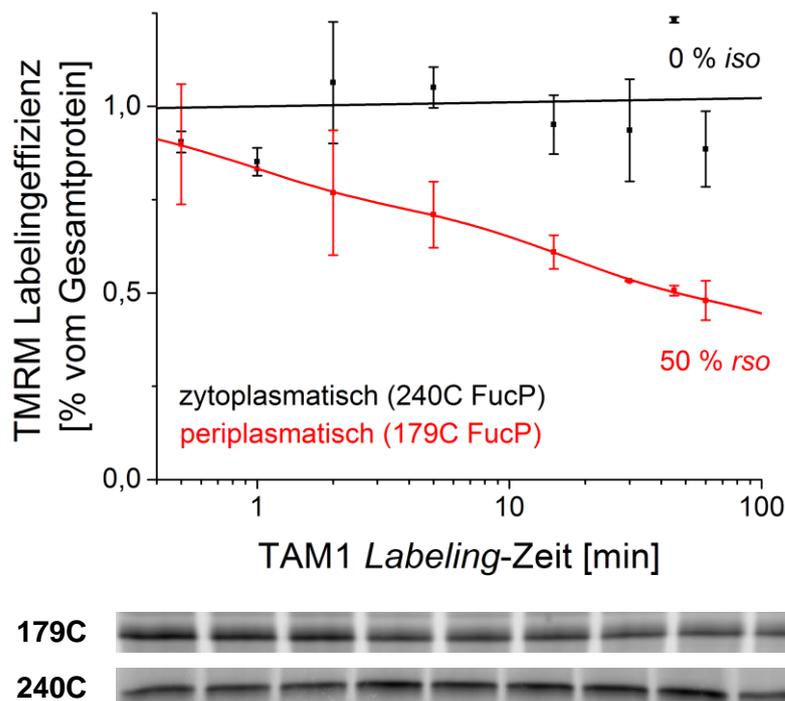
**Abbildung 70: Inhibition des *pre steady-state* Signals von wt GlcP durch Phloretin und Phlorizin.** Dargestellt ist der gemittelte prozentuale Peakstrom nach Inhibition bei entsprechendem pH-Wert. Die für die jeweilige Mittelung verwendete Anzahl an Datensätzen n ist im Graphen angegeben.

Phloretin und Phlorizin bewirkten eine Reduktion des Peakstroms in wt GlcP auf 25 % bis 60 % (Abbildung 70). Besonders auffällig ist die pH-Abhängigkeit der Inhibition durch Phlorizin: Bei pH 10 ist die Inhibition nur halb so effizient wie bei pH 5,5. Die Inhibition durch Phloretin ist weitestgehend pH-unabhängig. Für D22N sowie I105S GlcP wurden vergleichbare Ergebnisse erhalten (Daten nicht gezeigt). Die Peakströme der *pre steady-state* Reaktionen werden signifikant inhibiert, sodass die Inhibitoren bereits die Bindung der Substrate beeinflussen. Dabei ist festzuhalten, dass dies nicht unbedingt mit einer veränderten Transportrate korrelieren muss, da lediglich der direkte Einfluss auf die Ladungsverschiebung während des *induced fits* detektiert wird, wie in der Diskussion auf Seite 155f ausführlich beschrieben. Iancu et al. hat eine nahezu 100%ige Inhibition des GlcP Transports mit 1 mM Phloretin gezeigt [133].

## Bestimmung der Orientierung von FucP in Proteoliposomen

Damit ein durch die Topologie gegebenes, asymmetrisches Transporter-Verhalten im SSM-Experiment überhaupt detektiert werden kann, ist eine orientierte Probe notwendig. Für LacY ist die Orientierung in Proteoliposomen bekannt: Mindestens 85 % der Transporter sind *rso* orientiert [290]. Um die Orientierung von FucP in Proteoliposomen zu bestimmen wurden zwei Single-Cystein Mutanten verwendet und eine Folge von Cystein-Labeling Reaktionen durchgeführt [312, 313]. Dabei ist das Cystein in 240C FucP nur von der zytoplasmatischen Seite der Membran zugänglich, während das Cystein in 179C FucP periplasmatisch lokalisiert ist. Beide rekonstituierte Single-Cys Mutanten (5 mg/ml *E.coli* polar Lipid, LPR 5 in 100 mM KPi, pH 7,5) wurden für unterschiedliche Inkubationszeiten mit 400  $\mu$ M TAM1 behandelt (+ 20 mM DTT bei  $t = 0$  s,  $\Delta t = 0,5$  min bis 60 min,  $T = 22$  °C), einem Cystein-Labeling Reagenz, das nicht membrangängig ist. Nur bei Zugänglichkeit des Cystein-Restes, also bei entsprechender Orientierung innerhalb der Proteoliposomen, bindet TAM1 an das Cystein, sodass die Thiolgruppen für weiteres Labeling blockiert werden. Im Anschluss wurde TAM1 durch Verdünnung und Ultrazentrifugation entfernt. Es folgte die Solubilisierung mittels 0,5 % DDM und die Behandlung mit 40  $\mu$ M des Cystein-Labeling Reagenz TMRM (+ 20 mM DTT bei  $t = 0$  s,  $\Delta t = 30$  min,  $T = 0$  °C). Die TMRM-Fluoreszenz dient als Maß für die Menge während der TAM1-Labelingzeit nicht markierter Cystein-Reste. Um die Gesamtproteinmenge zu erhalten erfolgen bei einer Kontrollprobe für jede Single-Cys Mutante direkt die Solubilisierung und das TMRM Labeling. Die Proben wurden im Anschluss auf ein Gel aufgetragen und die Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{Ex}} = 533$  nm,  $\lambda_{\text{Em}} = 580$  nm) der einzelnen Banden bestimmt. In [Abbildung 71](#) ist die TAM1-Labelingzeit für beide Single-Cys Mutanten gegen die TMRM-Labelingeffizienz (TMRM-Fluoreszenz der Probe dividiert durch TMRM-Fluoreszenz des Gesamtproteins) aufgetragen.

Sinkt die TMRM-Labelingeffizienz mit der TAM1-Labelingzeit ist der entsprechende Cystein-Rest von außen zugänglich. Liegt keine Zeit-Abhängigkeit vor und ist die TAM1-Fluoreszenz gleich der Fluoreszenz des Gesamtproteins, so ist der entsprechende Cystein-Rest nicht von außen zugänglich. Es konnte gezeigt werden, dass 240C FucP nicht durch TAM1 markiert werden konnte. Da 240C zytoplasmatisch lokalisiert ist, deutet dies darauf hin, dass 240C FucP vollständig *rso* orientiert sein muss. 179C FucP hingegen zeigt eine mit der TAM1-Labelingzeit sinkende TMRM-Labelingeffizienz. Damit ist das periplasmatisch lokalisierte 179C zugänglich für TAM1-Labeling, was ebenso auf eine *rso* Orientierung hinweist. Es ist anzumerken, dass die TMRM-Labelingeffizienz jedoch lediglich auf 0,5 sinkt und kein vollständiges Labeling von 179C FucP möglich war. Demnach deuten die Messungen an 240C FucP auf eine vollständige *rso* Orientierung hin, während die Messungen an 179C FucP auf einen nicht-orientierten Einbau hinweisen.



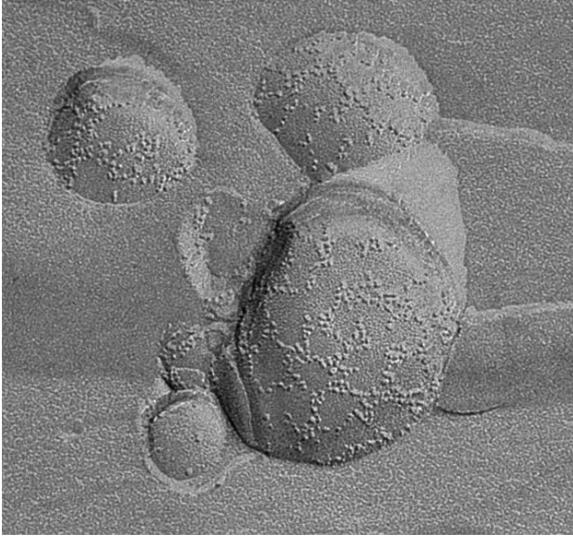
**Abbildung 71: Bestimmung der Transporter-Orientierung in Proteoliposomen mittels Cystein-Labeling der Single-Cys Mutanten 240C FucP und 179C FucP.** Dabei ist 240C ausschließlich zytoplasmatisch zugänglich, während 179C periplasmatisch lokalisiert ist. Die TMRM-Labelingeffizienz entspricht dem Quotienten aus TMRM-Fluoreszenz der für das TAM1-Labeling nicht-zugänglichen Cystein-Reste und der TMRM-Fluoreszenz des Gesamtproteins. Die einzelnen Datenpunkte entsprechen Mittelwerte aus drei Labeling-Ansätzen. Unten ist ein exemplarischer Scan eines Gels dargestellt. Eine nähere Beschreibung ist im Haupttext gegeben.

## Elektronenmikroskopische Gefrierbruchaufnahmen von D46N und wt FucP

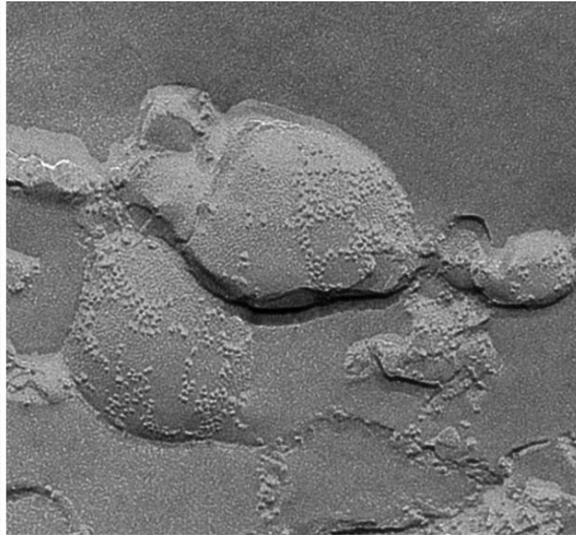
Für wt FucP und D46N FucP wurden elektronenmikroskopische Gefrierbruchaufnahmen angefertigt, um zu überprüfen, ob die mit LPR 5 rekonstituierten Proteoliposomen in verschiedenen Ansätzen auch hinsichtlich der effektiven LPR vergleichbare Proben ergeben [314]. Für wt LacY und E325A LacY ergaben sich zuvor 4.500 bzw. 3.500 Transporter pro  $\mu\text{m}^2$  [205]. Für wt FucP und D46N FucP ergeben sich vergleichbare Transporterdichten (Abbildung 72).

Es ist anzumerken, dass die meisten, etwa 90 % der Vesikel in der Gefrierbruchaufnahme keine Transporter enthalten und somit auf der SSM nicht zum detektierten Strom beitragen. Die Menge leerer Liposomen im Präparat ist jedoch vergleichbar zwischen den verschiedenen Rekonstitutionsansätzen. Eine verbesserte Rekonstitutionseffizienz könnte also die Transporterdichte auf der SSM und damit die Signalstärke erheblich erhöhen.

D46N FucP



WT FucP



**Abbildung 72: Elektronenmikroskopische Gefrierbruchaufnahmen von Proteoliposomen mit wt FucP und D46N FucP bei LPR 5.** Die dargestellten Abbildungen sind repräsentativ für die Proteoliposomen im Rekonstitutionsansatz, wobei etwa 90 % der Vesikel keine Transporter enthalten. Die Breite einer Abbildung beträgt 400 nm.

## Herleitung der Umsatzrate im MKM

Die Herleitung der Umsatzrate im MKM wurde von Prof. Dr. Klaus Fendler durchgeführt. Die Rate des Übergangs von der auswärtsgerichteten in die einwärtsgerichtete Konformation  $k_{1S}$  ist abhängig von der Rückreaktion des leeren Carriers  $j_r$  und der Vorwärtsreaktion des beladenen Carriers  $k_f$ . Der entgegengesetzte Übergang  $k_{2S}$  ist abhängig von  $j_f$  und  $k_r$ . Die Menge an Transporter in der einwärts- bzw. auswärtsgerichteten Konformation kann dann abhängig von  $k_{1S}$  und  $k_{2S}$  als  $T_i$  bzw.  $T_o$  geschrieben werden.

$$k_{1S}(pK_o) = j_r \cdot \frac{10^{-pK_o} \cdot K_{S_o}}{N_o(pK_o)} + k_f \cdot \frac{10^{-pH_o} \cdot c_{S_o}}{N_o(pK_o)}$$

$$\text{mit } N_o(pK_o) = 10^{-pH_o} \cdot K_{S_o} + 10^{-pK_o} \cdot K_{S_o} + 10^{-pH_o} \cdot c_{S_o}$$

$$k_{2S}(pK_o, pK_i) = j_f \cdot \frac{10^{-pK_i} \cdot K_{S_i}}{N_i(pK_i)} + k_r(pK_o, pK_i) \cdot \frac{10^{-pH_i} \cdot c_{S_i}}{N_i(pK_i)}$$

$$\text{mit: } N_i(pK_i) = 10^{-pH_i} \cdot K_{S_i} + 10^{-pK_i} \cdot K_{S_i} + 10^{-pH_i} \cdot c_{S_i}$$

$$T_i = T \cdot \frac{k_{1S}}{k_{1S} + k_{2S}} \quad \text{und} \quad T_o = T \cdot \frac{k_{2S}}{k_{1S} + k_{2S}}$$

Im Gleichgewicht können die Konzentrationen der einwärtsgerichteten (Index  $i$ ) und auswärtsgerichteten (Index  $o$ ) Transporter in den jeweiligen Zuständen des 6-Zustands-Modells

geschrieben werden als  $c_{Po}$  und  $c_{Pi}$  (leerer Carrier),  $c_{PHo}$  und  $c_{PHi}$  (protonierter Carrier) sowie  $c_{PHSo}$  und  $c_{PHSi}$  (beladener Carrier).

$$c_{Po} = \frac{10^{-pK_o} \cdot K_{So}}{N_o} \cdot T_o, \quad c_{Pi} = \frac{10^{-pK_i} \cdot K_{Si}}{N_i} \cdot T_i$$

$$c_{PHo} = \frac{10^{-pH_o} \cdot K_{So}}{N_o} \cdot T_o, \quad c_{PHi} = \frac{10^{-pH_i} \cdot K_{Si}}{N_i} \cdot T_i$$

$$c_{PHSo} = \frac{10^{-pH_o} \cdot c_{So}}{N_o} \cdot T_o, \quad c_{PHSi} = \frac{10^{-pH_i} \cdot c_{Si}}{N_i} \cdot T_i$$

Die Umsatzrate ([Gleichung G65](#)) ist dann abhängig von den äußeren Bedingungen sowie den kinetischen und thermodynamischen Parametern des Reaktionszyklus.

$$U(pK_o, pK_i, K_{So}, K_{Si}, k_f, k_r, j_f, j_r, pH_o, pH_i, c_{So}, c_{Si}, U_m) = c_{phso} \cdot k_f - c_{phsi} \cdot k_r \quad \mathbf{G65}$$

## Ein molekularer Mechanismus für Flusskopplung und pK-switch in LacY, FucP, XylE und GlcP

Die für LacY beschriebenen molekularen Mechanismen der Flusskopplung ([Seite 197f](#)) und der elektrostatischen Kopplung ([Seite 185f](#)) können auf die Transporter FucP, XylE und GlcP übertragen werden. Die hier vorgestellten Modelle wurden in enger Kollaboration mit Dr. Gregor Madej auf Basis seiner Homologie-Modelle entwickelt. Grundlage sind Vergleiche der 3D-Strukturen und die funktionale Homologie bestimmter Aminosäuren.

### FucP

FucP zeigt hinsichtlich des molekularen Mechanismus der Flusskopplung und pK-Verschiebung die größten Ähnlichkeiten zu LacY. Für FucP sind lediglich die 3D-Koordinaten einer Substrat-freien Konformation verfügbar [[131](#)]. In dieser Struktur befinden sich N42 und die Protonenbindestelle D46 in derselben relativen Position wie H322 und E325 in LacY. Zudem ist N42 über eine Wasserstoffbrücke mit der Hydroxylgruppe von Tyr101 auf dieselbe Weise gebunden wie H322- $\delta$ N durch Tyr236-OH im Grundzustand von LacY. Auf Basis der Ähnlichkeit zwischen FucP und LacY [[102](#)] sind D46 und N42 also mögliche Interaktionspartner in der Zucker-gebundenen Struktur. Dann würde N42 in FucP dieselben Funktionen übernehmen wie H322 in LacY, nämlich die der Flusskopplung im PMF-gekoppelten Zuckertransport und die der elektrostatischen Kopplung im Rahmen der pK-Verschiebung während des Transportzyklus.

Analog zu LacY könnte die Zuckerbindung eine Reorientierung von N42 induzieren, sodass N42- $\delta\text{NH}_2$  als Wasserstoffbrückendonator für eine OH-Gruppe der L-Fucose fungiert (*Seite A5, Abbildung 64c*). N42- $\delta\text{O}$  wiederum kann in diesem Szenario ausschließlich als Wasserstoffbrückenakzeptor für die protonierte Carboxylgruppe der Protonenbindestelle D46 fungieren. Ist D46 negativ geladen, findet diese Interaktion nicht statt. Dann fungiert N42- $\delta\text{O}$  als Wasserstoffbrückendonator für Tyr101 und N42- $\delta\text{NH}_2$  als Wasserstoffbrückenakzeptor für N43. Die Zuckerbindung wird also inhibiert, wenn D46 negativ geladen ist und stabilisiert, wenn D46 protoniert ist. Der Flusskopplungsmechanismus wäre dann analog zu dem in LacY.

Auf Basis der einzigen verfügbaren Struktur konnte ein pK-Wert für D46 im Zucker-gebundenen Zustand von 6,0 und im Zucker-freien Zustand von 7,7 berechnet werden. Die pK-Verschiebung wird durch die elektrostatische Kopplung zwischen N42 und D46 vermittelt. Beide pK-Werte stimmen sehr gut überein mit den simulierten pK-Werten der Protonenfreisetzung und -bindung von 6,4 bzw. 7,4 (*Seite A3, Tabelle 31*). Im Gegensatz zu H322 in LacY, kann über N42 in FucP kein interner Protonentransfer erfolgen. Protonenfreisetzung und -bindung finden demnach direkt über D46 statt. Dies wird dadurch ermöglicht, dass D46 im Gegensatz zu E325 in LacY in direktem Kontakt zur Wasser-gefüllten Kavität steht. Interessanterweise hat FucP kein Arginin in der Nähe von D46. Es konnte kein Rest identifiziert werden, der die negativ geladene Protonenbindestelle im leeren Carrier stabilisiert wie in LacY.

Es ist anzumerken, dass die auf der periplasmatischen Seite der Transmembrandomäne lokalisierte negative Ladung an E135 für den Transport in FucP von zentraler Bedeutung ist [315]. In E135Q FucP, also dem Äquivalent von wt FucP mit protoniertem E135, ist die Zuckerbindung blockiert [305]. Eine negative Ladung an dieser Position ist daher für die Bindung von L-Fucose notwendig. In der Literatur wurde E135 als primärer Protonenakzeptor vorgeschlagen [79]. Aufgrund der Lokalisation von E135 ist dies jedoch nicht mit symmetrischen Transporteigenschaften vereinbar. Zudem würde dies bedeuten, dass der Zucker vor dem Proton bindet und die anschließende Protonierung die Konformationsänderung induziert. E135 befindet sich an derselben relativen Position wie D240 in LacY, das dort nicht in die Protonenbindung involviert ist, aber ebenso eine für den Transport von D-Lactose essentielle Komponente darstellt [289]. Möglicherweise hat E135 in FucP eine ähnliche Funktion wie D240 in LacY.

## **XylE**

In LacY und FucP haben H322 bzw. N42 eine duale Funktion: Sie sind einerseits für die pK-Verschiebung im Zuge des Reaktionszyklus durch elektrostatische Kopplung mit der Protonenbindestelle, andererseits aber auch für die Flusskopplung bzw. Kooperativität zwischen

Zucker- und Protonenbindung verantwortlich. In XylE übernehmen diese Funktionen sehr wahrscheinlich unterschiedliche Aminosäuren.

Die Protonenbindestelle D27 in XylE bildet wie E325 in LacY und D46 in FucP keinen direkten Kontakt mit dem Zucker [132, 142]. Die Strukturen zeigen, dass eine indirekte Interaktion zwischen D27 und der C4OH-Gruppe der D-Xylose über Thr28 und H<sub>2</sub>O606 hergestellt werden könnte. Thr28 in XylE könnte somit die Flusskopplungsfunktion von H322 in LacY und N42 in FucP übernehmen. In der Substrat-gebundenen Struktur interagiert D27 elektrostatisch mit R133 und E206. Es ergeben sich pK-Werte für D27 und E206 von 9,2 bzw. 7,3. Der pK-Wert von 9,2 stimmt mit dem simulierten pK-Wert von 8,6 für die Protonenbindung überein (Seite A3, Tabelle 31), sodass die Protonierung sehr wahrscheinlich direkt über D27 erfolgt, ähnlich wie in FucP. E206 und R133 induzieren aufgrund der elektrostatischen Kopplung mit D27 die pK-Verschiebung, wie H322 in LacY und N42 in FucP.

Nach Substratfreisetzung koppeln D27 und E206 nicht mehr miteinander. Die Konformationsänderung in XylE, die zur pK-Verschiebung führt, ist im Gegensatz zu der in LacY und FucP von globaler Natur. Statt der Rotation eines Aminosäurerestes, öffnet sich der Winkel zwischen Helix-I und Helix-VI, wodurch sich E206 von D27 entfernt und die elektrostatische Kopplung der Reste verhindert wird (Seite A5, Abbildung 64b). Die pK-Werte im Substrat-freien Zustand ergeben sich dann zu 5,0 bzw. > 10,5 für D27 und E206. Der pK-Wert von D27 stimmt gut mit dem simulierten pK-Wert von 4,7 für die Protonenfreisetzung überein (Seite A3, Tabelle 31). Das Proton dissoziiert demnach sehr wahrscheinlich nach der Xylose-Freisetzung direkt von D27.

R133 stabilisiert ähnlich wie R302 in LacY den unprotonierten Zustand [129]. Auch in GLUT1 existiert ein Arginin (R126), das allerdings nicht mit der zur Protonenbindestelle der *E.coli* Transporter homologen Aminosäure N29 interagiert. Das Arginin wechselwirkt also immer mit der negativ geladenen Protonenbindestelle um den Carrier im unprotonierten Zustand zu stabilisieren. In XylE hat das Arginin im Gegensatz zu LacY darüber hinaus noch eine weitere Funktion. Es liefert einen großen Coulomb'schen Beitrag zur Wechselwirkung zwischen D46 und E206 und ermöglicht so die pK-Verschiebung im Zuge des Transportzyklus. Dass sich die Funktionen von R133 in XylE und R302 in LacY grundlegend voneinander unterscheiden, zeigen auch die unterschiedlichen Phänotypen entsprechender Mutanten. Während R302A LacY eine reduzierte *Uptake*-Aktivität aufweist und der Lactose-Austausch, der keine Protonenfreisetzung benötigt, nahezu unbeeinträchtigt bleibt [287], sind im Falle von R133A XylE sowohl Xylose-*Uptake* als auch -Austausch vollständig blockiert [132]. Die in diesem Modell zu R133A XylE funktional homologe Mutante H322A LacY zeigt ebenfalls keine *Uptake*-Aktivität mehr [316, 317].

Für XylE konnte gezeigt werden, dass die Transportrate von der Protonierung zweier Aminosäuren mit unterschiedlichen pK-Werten abhängig ist. Die Inhibition des Transports im basischen pH-Bereich muss durch zwei pKb-Werte beschrieben werden (Seite 103, Tabelle 19). Interessanterweise stimmt der theoretisch berechnete pK-Wert von E206 (7,3) sehr gut mit dem zweiten apparenten pKb-Wert (7,7) überein (Seite A3, Tabelle 31). Da es sich bei E206 neben R133 und D27 um die einzige geladene Aminosäure innerhalb der Transmembrandomäne handelt, deren Mutation zugleich die Transportaktivität einschränkt [142], könnte die Protonierung von E206 für den Transport eine Rolle spielen.

### Ein Allgemeines Prinzip

In jedem der untersuchten Transporter konnten einzelne Aminosäurereste identifiziert werden, die essentielle Funktionen im Verlauf des Transportzyklus übernehmen, teilweise abweichend von der ursprünglichen Zuordnung der Aminosäuren nach Madej et al. [144]. Dabei sind drei Funktionen strikt voneinander zu unterscheiden (Tabelle 33). (1) Die Protonenbindung. (2) Die elektrostatische Kopplung mit der Protonenbindestelle, welche die Verschiebung der pK-Werte induziert. (3) Die Kopplung zwischen Protonenbindestelle und Zuckerbindestelle zur Stabilisierung des protonierten Zucker-gebundenen Zustands (Flusskopplung).

**Tabelle 33: Wichtige funktional homologe Aminosäure-Reste in LacY, FucP, XylE und GlcP.** Drei wesentliche Funktionen sind voneinander zu unterscheiden: Protonenbindung, Flusskopplung und elektrostatische Kopplung. Die der pK-Verschiebung zugrunde liegende Konformationsänderung unterscheidet sich in den Transportern. In LacY rotiert das Imidazol von H322, in FucP erfolgt die pK-Verschiebung durch Rotation von N42. In XylE hingegen ändert sich der Abstand der koppelnden Reste durch eine Änderung des Öffnungswinkels zwischen den periplasmatischen Teilen von Helix-I und Helix-VI.

	Protonen- bindung	Fluss- kopplung	Elektrostatische Kopplung	pK-Verschiebung	
				$\Delta pK_{app}$	$\Delta pK_{sim}$
LacY	E325	H322/Y236	H322	3	2
FucP	D46	N42/Y101	N42	3	1
XylE	D27	T28/H <sub>2</sub> O606	R133/E206	5	4
GlcP	D22	--	--	--	--

Es konnte gezeigt werden, dass sich der pK-Wert der Protonenbindestelle durch elektrostatische Kopplung mit einer funktional wichtigen Aminosäure ändert. Die Protonenbindestelle kann deshalb zwei verschiedene pK-Werte annehmen, statt dass die zwei experimentell bestimmten pK-Werte unterschiedlichen Aminosäuren zuzuordnen wären. Protonenaufnahme und Protonenabgabe erfolgen mit unterschiedlichen pK-Werten, unabhängig davon ob der Transporter in der einwärts-

oder der auswärtsgerichteten Konformation vorliegt, sodass die Transportsymmetrie aufrechterhalten wird. Influx und Efflux sollten daher ähnliche Transport-Kinetiken aufweisen. Die der pK-Verschiebung zugrunde liegenden Konformationsänderungen sind meist lokal und daher sehr wahrscheinlich schnell. Sie könnten als schnelle Gleichgewichte betrachtet werden.

Die Zuckerbindung induziert in allen Transportern über das nachgeschaltete Gleichgewicht indirekt die pK-Verschiebung in Richtung Protonenaufnahme-pK-Wert, was den Transport antreibt. Gleichzeitig ist im Zucker-gebundenen Zustand der pK-Wert in Richtung Protonenfreisetzung-pK-Wert verschoben, sodass nach der Zuckerfreisetzung direkt die Protonenfreisetzung folgen kann. Ob und wie sichergestellt ist, dass nach der Deprotonierung die erneute pK-Verschiebung erst dann folgt, wenn die Konformationsänderung des leeren Carriers bereits stattgefunden hat, ist jedoch unklar.

Auffällig ist insbesondere die Korrelation zwischen der Polarisierbarkeit des für die elektrostatische Kopplung verantwortlichen Restes und dem Grad der simulierten pK-Verschiebung in den einzelnen *E.coli* Transportern ([Tabelle 33](#)). So bewirkt das geladene Aminosäurepaar E206/R133 in XylE mit  $\Delta pK = 4$  die größte pK-Verschiebung und der neutral geladene aber polare Rest N42 in FucP mit  $\Delta pK = 1$  die geringste pK-Verschiebung. H322 in LacY, das sowohl positiv als auch neutral geladen vorliegen kann, zeigt demnach eine mittlere pK-Verschiebung von  $\Delta pK = 2$ . Diese Beobachtung stützt das Modell für die pK-Verschiebung durch elektrostatische Kopplung weiter.

Die Transporter unterscheiden sich jedoch auch in wesentlichen Punkten voneinander: So zeigen die pKa-Kalkulationen, dass lediglich in LacY ein interner Protonentransfer stattfindet, nicht aber in FucP und XylE. Im Vergleich zu LacY zeigen FucP und XylE auch eine geringere Anzahl transmembranständiger geladener Aminosäuren. So konnten nur in LacY Aminosäuren identifiziert werden (R302/D240/K319), die zur Stabilisierung des unprotonierten Carriers beitragen. Darüber hinaus kommt die als Grundzustand bezeichnete Konformation ausschließlich in LacY vor. In FucP und XylE gibt es keine Evidenzen für einen Grundzustand, der zum Protonenaufnahme- und Protonenabgabe-pK-Wert unterschiedliche pK-Werte annehmen könnte. Möglicherweise ist ein protonierter Grundzustand wie in LacY deshalb nicht notwendig, weil kein interner Protonentransfer erfolgt. Für GlcP gibt es bisher keine experimentellen Evidenzen, dass eine zu den *E.coli* Transportern äquivalente pK-Verschiebung während des Transportzyklus stattfindet, da im SSM-Experiment unter symmetrischen pH-Bedingungen ausschließlich *pre steady-state* Signale detektiert werden konnten ([Seite 118, Abbildung 41](#)). Desweiteren deuten die experimentellen Daten darauf hin, dass sich die Flusskopplung in GlcP genau entgegengesetzt zu der in *E.coli* Transportern verhält. In GlcP führt die Protonierung des Transporters zu einer geringeren Affinität zum Zucker ([Seite 121, Tabelle 22](#)).