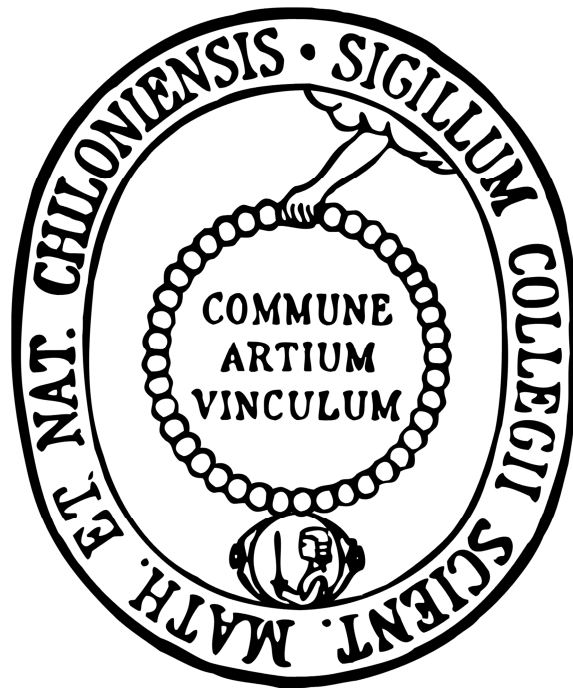


Transportmechanismus und Selektivität der Formiat-Nitrit-Transporter



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Marie Inken Wiechert

Kiel 2017

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Eric Beitz

Zweiter Gutachter:

Dr. Jochen Hub

Tag der mündlichen Prüfung:

24.07.2017

Zum Druck genehmigt:

24.07.2017

gez. Prof. Dr. Natascha Oppelt
(Dekanin)

Für meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Die physiologische Rolle von Formiat-Nitrit-Transportern	2
1.1.1 FNTs in Prokaryoten	2
1.1.2 Der Formiat-Nitrit-Transporter in <i>Plasmodium falciparum</i>	5
1.1.3 FNTs in weiteren Eukaryoten	6
1.2 Struktur der FNTs.....	7
1.3 Substratspezifität	10
1.4 Transportmechanismus der FNTs	12
1.4.1 Bisherige experimentelle Daten.....	12
1.4.2 Theoretische Modelle	13
1.5 Zielsetzung der Arbeit	15
2 Material	17
2.1 Enzyme, Chemikalien, Kits, Material	17
2.2 Geräte	19
2.3 Plasmide	21
2.4 Kodierende DNA-Sequenzen	22
2.5 Oligonukleotide (<i>primer</i>)	22
2.6 <i>E. coli</i> -Stämme.....	25
2.7 <i>S. cerevisiae</i> -Stämme	25
2.8 Antikörper.....	26
2.9 Puffer, Medien, Lösungen	26
2.9.1 Molekularbiologie	26
2.9.2 Proteinchemie	28
2.9.3 ¹⁴ C-Substrataufnahmeassay	29
2.9.4 pH-Messungen von Hefesuspensionen.....	31
3 Methoden.....	33
3.1 Molekularbiologische Methoden	33
3.1.1 Agarose-Gel-Elektrophorese	33

3.1.2	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	34
3.1.3	DNA-Plasmid-Isolierung aus Bakterien	34
3.1.4	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	34
3.1.5	Restriktionsverdau	34
3.1.6	Dephosphorylierung	34
3.1.7	Ligation	35
3.1.8	Transformation von <i>E. coli</i>	35
3.1.9	Schnelltransformation von <i>E. coli</i>	35
3.1.10	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	35
3.1.11	Dauerkulturen von <i>E. coli</i>	36
3.1.12	Dauerkulturen von <i>S. cerevisiae</i>	36
3.1.13	Polymerasekettenreaktion.....	36
3.1.14	<i>In vitro</i> Mutagenese.....	37
3.1.15	DNA-Sequenzierung	38
3.1.16	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	39
3.1.17	Generierung N-terminal verkürzter FocA-Konstrukte	39
3.2	Proteinchemische Methoden	40
3.2.1	Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus <i>S. cerevisiae</i>	40
3.2.2	Proteinquantifizierung.....	40
3.2.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
3.2.4	Western Blot	41
3.3	Funktionsstudien in <i>S. cerevisiae</i>	42
3.3.1	Aufnahmeassay mit ¹⁴ C-markierten Substraten.....	42
3.3.2	pH-Messungen.....	45
3.4	Funktionsstudien in <i>E. coli</i>	46
3.5	Bioinformatische Methoden	46
3.5.1	Bestimmung der Schnittfläche des Proteintransportpfades.....	46
3.5.2	Poisson-Boltzmann-elektrostatische Berechnungen.....	47
3.5.3	Bestimmung des pK _s von Aminosäuren innerhalb eines Proteins	47
3.5.4	Solvatationsmodelle von Proteinen	47
4	Ergebnisse.....	49
4.1	Substratselektivität von FNTs.....	49
4.1.1	Herstellung von FNTs in <i>S. cerevisiae</i>	49
4.1.2	Ermittlung von Substratprofilen	51
4.1.3	Identifizierung eines potentiellen Selektivitätsfilters	54
4.1.4	Rolle der lipophilen Konstriktionen für die Substratselektivität	56

4.1.5	Mutationsanalyse des <i>Pf</i> FNT-Selektivitätsfilters	59
4.1.6	Mutationsanalyse des <i>FocA</i> -Selektivitätsfilters	62
4.1.7	Auswertung	65
4.2	Untersuchung des Resistenzmechanismus von <i>Pf</i> FNT	67
4.3	Formiat-Protonen-Symport von <i>FocA</i>	69
4.3.1	pH-abhängige Formiataufnahme via <i>FocA</i>	69
4.3.2	Mediumalkalisierung während Formiataufnahme via <i>FocA</i>	70
4.3.3	Inkubation von <i>FocA</i> mit Protonenentkopplern	71
4.3.4	Untersuchung der Protonierung mithilfe des Schwerwassereffektes	72
4.3.5	Bestimmung der Substrataffinität.....	74
4.3.6	Einfluss von Salzen auf die Substrataufnahme.....	74
4.3.7	Untersuchung der pH-Abhängigkeit im <i>E. coli</i> -System	75
4.4	Transportmechanismus der FNTs	77
4.4.1	Herstellung von <i>FocA</i> - und <i>Pf</i> FNT-Mutanten in <i>S. cerevisiae</i>	78
4.4.2	Mutationsanalysen innerhalb der lipophilen Konstriktionen	79
4.4.3	Mutationsanalysen im Poreneingang.....	81
4.4.4	Anziehung von Substratanionen durch das Lysin im Poreneingang	84
4.4.5	Rolle des N-Terminus für den Transportmechanismus.....	88
4.5	Dielektrische Verschiebung der Substratazidität.....	91
4.5.1	Verringerung der Substratazidität im hydrophoben FNT.....	91
4.5.2	Bestimmung der Aktivierungsenergie	93
4.5.3	Rolle von K156 an der Protonierung.....	95
5	Diskussion.....	99
5.1	Evaluierung des <i>S. cerevisiae</i> -Testsystems	99
5.2	Selektivität der FNTs	104
5.2.1	Substratelektivität	104
5.2.2	Ladungsselektivität.....	108
5.3	Ein FNT-Transportmodell	109
5.3.1	Substratanionen-Protonen-Symport	109
5.3.2	Elektrostatische Anziehung	110
5.3.3	Verschiebung der Substratazidität und Protonierung des Anions	111
5.3.4	Modell des Mechanismus.....	114
5.3.5	Direktionalität	115
5.4	Übertragung des FNT-Transportmechanismus auf andere Proteinfamilien	117
5.4.1	Kanäle oder Transporter?	117
5.4.2	Chloridtransporter	118

5.4.3	Aquaporine.....	119
5.4.4	Ammoniumtransporter.....	120
5.5	Ausblick.....	122
6	Zusammenfassung	125
7	Summary	127
8	Literaturverzeichnis	129
	Eidesstattliche Erklärung.....	143
	Lebenslauf	145

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP	Aquaporin
<i>Aqua bidest.</i>	gereinigtes Wasser
as	<i>antisense</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CCCP	Carbonylcyanid- <i>m</i> -chlorophenylhydrazon
CIC	<i>Chloride channel</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribunucleic acid</i>)
DNP	2,4-Dinitrophenol
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FNT	Formiat-Nitrit-Transporter
FocA	<i>Formate channel A</i>
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
His	Histidin
HSC	<i>Hydrosulfide channel</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
LB	<i>Luria broth</i> (Nährmedium zur Aufzucht von <i>E. coli</i> nach Luria und Burrous)
MCT	Monocarboxylattransporter
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>

Abkürzungsverzeichnis

MTBST	Tris- <i>buffered saline</i> mit Tween 20 [®] und Milchpulver
MTSEA	2-Aminoethylmethanthiosulfonat
MTSES	2-Sulfonatoethylmethanthiosulfonat
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
s	<i>sense</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD-Medium	Synthetisches Dextrose-Minimalmedium zur Selektion von transformierten <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Zellen
SDS	Natriumlaurylsulfat
S.E.M.	<i>Standard error of the mean</i> (Standardfehler)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris- <i>buffered saline</i>
TBST	Tris- <i>buffered saline</i> mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembranspanne
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Units</i>
WT	Wildtyp
YNB	<i>Yeast nitrogen base</i>
YPD	Reichhaltiges Nährmedium zur Aufzucht von untransformierten <i>S. cerevisiae</i> (<i>yeast extract peptone dextrose</i>)

1 Einleitung

Das weltweit steigende Auftreten von antimikrobiellen Resistenzen stellt unsere Gesellschaft vor eine große Herausforderung für die globale Gesundheit. Antimikrobielle Resistenz resultiert in der erniedrigten Effizienz von antibiotischen, antiviralen, antiparasitären und fungiziden Wirkstoffen. Dem Auftreten von Resistenzen liegen dabei drei Mechanismen zugrunde: Das Ausschleusen der Wirkstoffe aus der Zelle durch Effluxpumpen, Modifikationen des Wirkstoffes durch Enzyme und Punktmutationen an den Bindestellen der Wirkstoffziele (Reeve et al, 2015). Durch die genaue Untersuchung der Zielstrukturen können darauf basierend Wirkstoff-Resistenzen genutzt werden, um neue Wirkstoffe zu entwickeln. Aber auch neue Zielstrukturen für antimikrobielle Wirkstoffe sind dringend nötig, um das weltweite Resistenzproblem zu lösen (Holmes et al, 2016; Laxminarayan et al, 2016).

Membranständige Transportproteine spielen eine essentielle Rolle in biochemischen Vorgängen jeder Zelle. Sie sind verantwortlich für die ionische Homöostase, die Aufnahme von biosynthetischen und metabolischen Substraten sowie die Ausschleusung metabolischer Endprodukte. Ist ein Transport gestört, kann dies schwerwiegende Folgen für den Organismus haben – im Menschen gibt es mehr als 60 Erkrankungen, die auf eine genetisch bedingte gestörte Funktion eines Transporters oder Kanals zurückzuführen sind, zum Beispiel Cystische Fibrose oder Neurodegeneration (Diallinas, 2014). Doch vor allem in Bezug auf pathogene Mikroorganismen ist in den letzten Jahrzehnten das Interesse an der Möglichkeit gestiegen, dass Transportproteine die Basis für neue antimikrobielle Wirkstoffe darstellen. Zudem setzt die Wirkstoffentwicklung auf rationaler Basis die genaue Untersuchung der physiologischen Rolle, der Substratspezifität, Struktur und des Mechanismus der Transportproteine voraus.

1.1 Die physiologische Rolle von Formiat-Nitrit-Transportern

Die Formiat-Nitrit-Transporter (FNT) kommen ausschließlich in Bakterien, Algen, Pilzen, Apikomplexa und Amöben vor (Marchetti et al, 2015). Dort sind sie weit verbreitet und übernehmen die Rolle des Transportes von kleinen negativ geladenen Molekülen wie Formiat, Acetat, L-Laktat sowie Hydrogensulfid, Nitrit und Chlorid durch die Membran. FNTs sind somit von zentraler Bedeutung für den Stoffwechsel des jeweiligen Organismus (Lü et al, 2013).

Dagegen wird der Transport von Monocarboxylaten im Menschen von den Monocarboxylat-transportern (MCT) übernommen. Sie sind für den Transfer von L-Laktat, Pyruvat und Ketonkörpern wie Acetoacetat oder β -Hydroxybutyrat über die Plasmamembran von Zellen zuständig. Damit spielen sie eine wichtige Rolle in der Gluconeogenese, Lipogenese, Oxidation und dem Ketonkörpermetabolismus (Halestrap & Wilson, 2012).

Strukturell sind beide Transporterfamilien nicht miteinander verwandt (Halestrap, 2012).

1.1.1 FNTs in Prokaryoten

Formiat ist ein Schlüsselmetabolit innerhalb des Energiemetabolismus von vielen Bakterien (Leonhartsberger et al, 2002). Aufgrund seines niedrigen Redoxpotentials von -420 mV kann es innerhalb der Atmungskette oxidiert werden oder unter anaeroben Bedingungen als Elektronendonator für Reduktasen genutzt werden (Pinske & Sawers, 2016). Ein Drittel der aufgenommenen Glucose in Enterobakterien wird im Rahmen der Fermentation über Pyruvat durch die Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL) zu Formiat und Acetyl-CoA umgesetzt (Stokes, 1949; Knappe & Sawers, 1990; Sawers & Clark, 2004). Eine Akkumulation des Formiats würde zu einer starken Ansäuerung innerhalb der Zelle führen. Über die Formiat-Hydrogenlyase-Reaktion (FHL) kann es zu Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff umgesetzt werden (Stephenson & Stickland, 1932). Für den transmembranären Transport ist der Formiattransporter FocA, ein FNT, zuständig, der durch das *focA* Gen kodiert wird (Suppmann & Sawers, 1994). Dieses Gen liegt im selben Operon wie das kodierende Gen der Pyruvat-Formiat-Lyase, sodass beide Genprodukte gleichzeitig hergestellt werden (Sawers & Bock, 1988; Sawers, 2006; Suppmann & Sawers, 1994). Wird Formiat aus der Zelle herausgeschleust, kann es durch membranständige Dehydrogenasen zu Kohlenstoffdioxid oxidiert werden (Sawers, 1994).

In Archaeobakterien kommen ebenfalls FNTs vor, zum Beispiel die Formiatpermease FdhC aus *Methanobacterium formicicum* (White & Ferry, 1992; Nolling & Reeve, 1997).

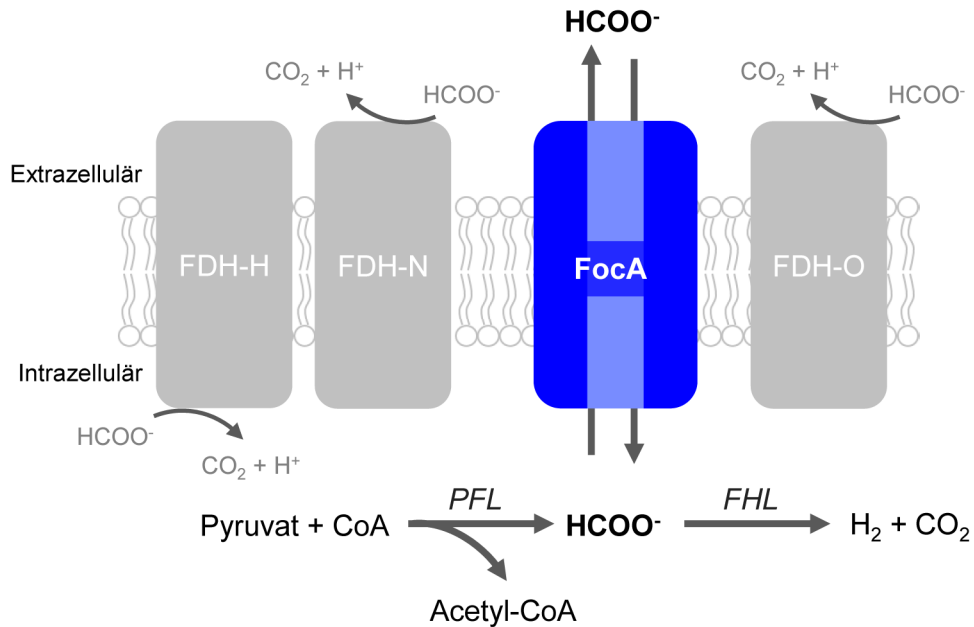


Abb. 1.1: Formiatstoffwechsel in Bakterien. Modifiziert nach (Waight et al, 2013)

Pyruvat und Coenzym A werden durch die Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL) zu Formiat und Acetyl-CoA umgesetzt. Formiat wird entweder durch die Formiat-Hydrogen-Lyase (FHL) zu Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid umgesetzt oder via FocA aus der Zelle herausgeschleust bzw. durch membranständige Formiatdehydrogenasen (FDH) umgesetzt. FDH-H wird innerhalb des anaeroben Stoffwechsels induziert, FDH-N und FDH-O während des aeroben Stoffwechsels.

Innerhalb des anaeroben Wachstums reduzieren Enterobakterien Nitrat über Nitrit zu Ammonium, somit spielen diese innerhalb des Stoffwechsels eine wichtige Rolle für den Elektronentransfer sowie für biosynthetische Prozesse (Cole, 1996; Jia & Cole, 2005). Zwei Transporter der Nitrat-Nitrit-Porter-Familie (NNP, zur *major facilitator superfamily* gehörend), NarK und NarU, sind in *Escherichia coli* (*E. coli*) für die Nitrataufnahme sowie den Nitritimport und -export zuständig (Yan et al, 2013; Fukuda et al, 2015), während ein FNT, NirC, ausschließlich Nitrit transportiert (Peakman et al, 1990; Clegg et al, 2002; Jia et al, 2009; Fukuda et al, 2015; Yan et al, 2013). Das NirC-Gen liegt im selben Operon wie das NADPH-abhängige Nitrit-Reduktase-Gen (NIR), das für ein membranständiges Enzym kodiert, welches für die Reduktion des Nitrits zu Ammonium verantwortlich ist (Peakman et al, 1990). Weiterhin spielt NirC in der Pathogenität von *Salmonella typhimurium* eine entscheidende Rolle (Das et al, 2009). Das beim Menschen Gastroenteritis verursachende Bakterium proliferiert in Makrophagen (Hohmann et al, 1995) – diese exprimieren Stickstoffmonoxid-Synthase, welche durch Stimulantien wie *Salmonella* oder Interferon- γ induziert wird. Dadurch wird die Stickstoffmonoxid-Generierung katalysiert und es kommt zur Phagozytose von Zellen (Groote et al, 1995; Shiloh et al, 1999; Chakravorty & Hensel, 2003). Durch die Nitrataufnahme via NirC in Salmonellen wird die

Generierung des zelltoxischen NO verringert und somit die Phagozytose des pathogenen Erregers verhindert (Das et al, 2009). NirC gehört somit zum natürlichen Abwehrmechanismus des Erregers.

Weitere Nitrittransporter der FNT-Familie wurden bereits identifiziert und näher untersucht: TpNirC aus dem thermophilen Archaeobakterium *Thermophilum pendens* (Beckham et al, 2010) sowie NitM aus dem Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* (Maeda et al, 2015).

Auch Hydrogensulfid ist als Substrat der FNTs identifiziert worden. Es wird innerhalb des anaeroben Wachstums als Produkt der assimilatorischen und dissimilatorischen Sulfatreduktion gebildet (Kabil & Banerjee, 2010). Das zelltoxische Hydrogensulfid anion wird durch den Hydrogensulfidkanal HSC aus der Zelle herausgeschleust. Dieser ist Teil des *asr*-Operons und wird ebenfalls als AsrD bezeichnet, da es sich auf demselben Operon wie das Gen der assimilatorischen Sulfidreduktase ASR befindetet, welche für die Reduktion von Sulfid zu Hydrogensulfid zuständig ist (Czyzewski & Wang, 2012).

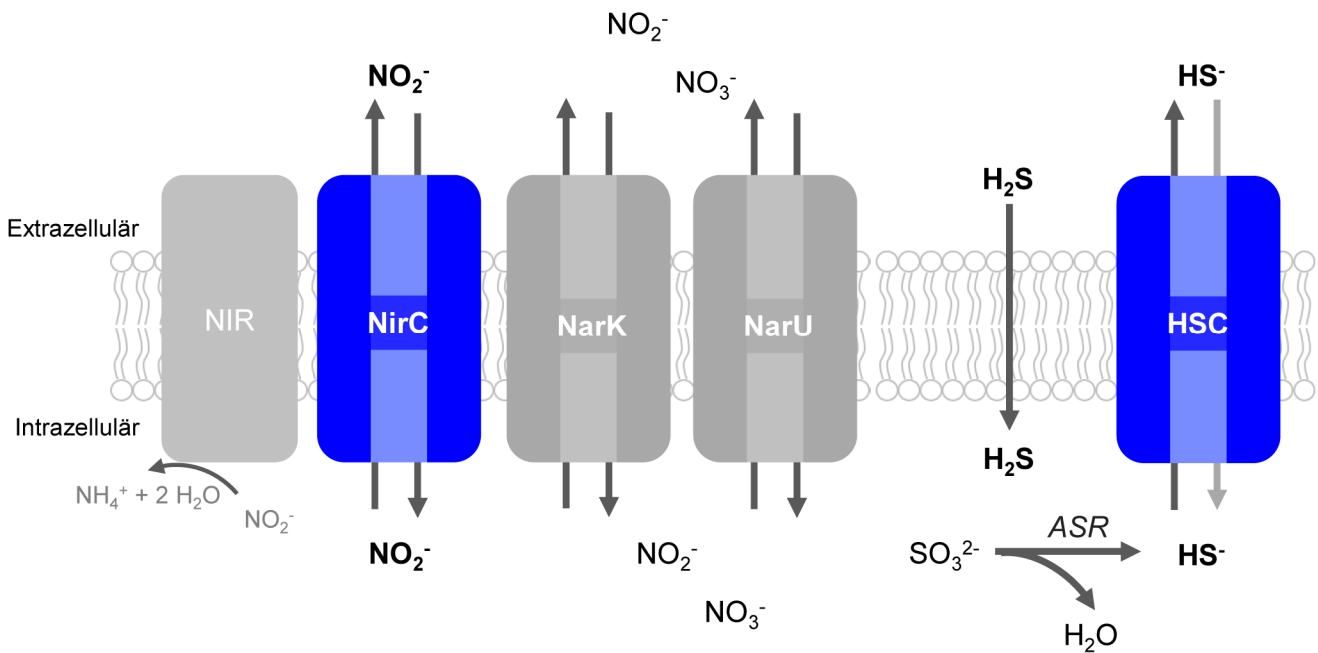


Abb. 1.2: Bakterieller Nitrit- und Hydrogensulfidstoffwechsel. Modifiziert nach (Waight et al, 2013)

Eingeschleustes Nitrit wird von der membranständigen Nitritreduktase NIR zu Ammonium reduziert. Import und Export von Nitrit erfolgen über den FNT NirC sowie die Transporter NarK, NarU, der Import und Export von Nitrat über NarK und NarU.

Sulfid wird intrazellulär durch die assimilatorische Sulfidreduktase ASR zu Hydrogensulfid reduziert. Dieser zelltoxische Metabolit wird durch den Hydrogensulfidkanal HSC aus der Zelle transportiert.

1.1.2 Der Formiat-Nitrit-Transporter in *Plasmodium falciparum*

Malaria ist mit jährlich etwa 200 Millionen Neuinfektionen eine große Bedrohung für unsere heutige Gesellschaft (World Health Organization, 2016). Sie wird durch verschiedene Parasiten der Gattung *Plasmodium* verursacht, welcher einen komplexen Lebenszyklus mit mehreren Stadien in der weiblichen Anophelesmücke und im Menschen besitzt. *Plasmodium falciparum* ist der Erreger der schwersten Form der Malaria, *Malaria tropica*, und befällt während seines asexuellen Zyklus menschliche Erythrozyten (Cowman & Crabb, 2006). Dabei durchläuft er mehrere Zyklen des Wachstums (Trophozitenstadium) und der Vermehrung (Schizontenstadium) (Bray & Garnham, 1982). Das Erythrozytenstadium ist während der Infektion für die meisten Krankheitssymptome wie zum Beispiel Fieberschübe, Anämie, Erbrechen und Diarrhoe verantwortlich (Miller et al, 2002).

Werden Erythrozyten von *Plasmodium falciparum* befallen, haben Sie einen 25 bis 75-fach erhöhten Bedarf an Glucose, was am steigenden Energieumsatz während des Trophozitenstadiums des Parasiten liegt (McKee et al, 1946; Sherman, 1998; Jensen et al, 1983). Der Parasit ist innerhalb des roten Blutkörperchens von einer parasitären Vakuolenmembran und einer Plasmamembran umgeben, über welche durch Transportproteine wichtige Nährstoffe und Energiebausteine aus dem Erythrozyten bezogen werden müssen (Aikawa et al, 1978; Sherman, 1979). *Plasmodium falciparum* ist im Blutstadium zur Energiegewinnung vollständig auf die Glykolyse angewiesen – denn obwohl alle Gene der Enzyme des Citratzyklus im Parasiten vorhanden sind, ist dieser während des Stadiums im Menschen nicht funktionell (van Dooren et al, 2006).

Glucose gelangt über den humanen Glucosetransporter GLUT1 in die Erythrozyten und wird in den Parasiten über den Hexosetransporter HT1 aufgenommen (Mueckler et al, 1985; Woodrow et al, 1999; Krishna & Woodrow, 1999; Krishna et al, 2000). Durch die Glykolyse und die anschließende Reduktion des Pyruvats fällt in infizierten Zellen Laktat an (Pfaller et al, 1982). Dabei wird 1 mol Glucose zu jeweils 2 mol Laktat, Protonen sowie ATP umgesetzt. Die Ausschleusung des Laktats über die parasitäre Plasmamembran ist nötig, um eine Azidifizierung, osmotischen Stress und die Veränderung des Redoxstatus zu vermeiden (Elliott et al, 2001; Cranmer et al, 1995). Dass es sich bei dem verantwortlichen Laktattransporter um einen FNT-Vertreter handelt, *PfFNT*, wurde erst vor kurzem von unserer Arbeitsgruppe sowie der Arbeitsgruppe von Kiaran Kirk entdeckt (Wu et al, 2015; Marchetti et al, 2015). Aus der Erythrozytenplasmamembran wird das Laktat über den Monocarboxylattransporter MCT1 ausgeschleust oder diffundiert als Milchsäure aus der Zelle (Poole & Halestrap, 1994; Deuticke, 1982).

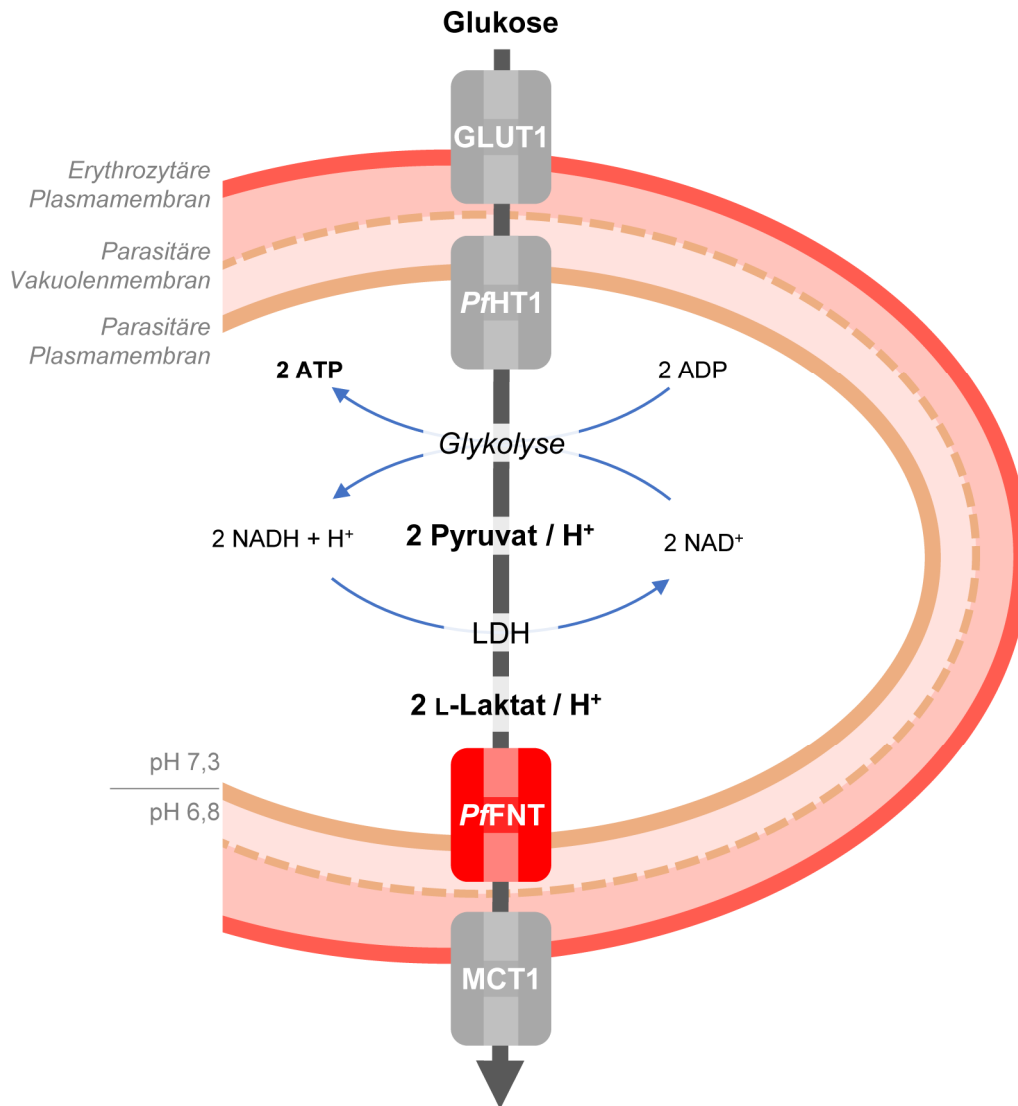


Abb. 1.3: Energiemetabolismus von *Plasmodium falciparum* im erythrozytären Trophozitenstadium. Modifiziert nach (Wu et al, 2015; Krishna et al, 2000)

GLUT1: humaner Glucosetransporter 1; PfHT1: Hexosetransporter von *Plasmodium falciparum*;

LDH: Laktatdehydrogenase; PfFNT: Formiat-Nitrit-Transporter aus *Plasmodium falciparum*;

MCT1: humaner Monocarboxylattransporter 1

1.1.3 FNTs in weiteren Eukaryoten

Ebenfalls übernimmt ein FNT die Ausschleusung des metabolischen Endproduktes Laktat im parasitären Erreger der bovinen Babesiose, *Babesia bovis*, (Barry, 1984; Golldack et al, 2017).

Weitere bereits charakterisierte eukaryotische Nitrit-Transporter der FNT-Familie sind NitA des Pilzes *Aspergillus nidulans* (Beckham et al, 2010; Unkles et al, 2011) und NAR1 aus der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* (Rexach et al, 2000).

Auch in *Euglena gracilis*, dem Augentierchen, konnte ein FocA Homolog identifiziert werden. Die physiologische Rolle und Funktionalität ist nicht gesichert, jedoch wurde der Transporter bei cadmiumresistenten Zellen überexprimiert (Delomenie et al, 2007).

1.2 Struktur der FNTs

Monocarboxylattransporter, Glucosetransporter und Nitrat-Nitrit-Porter gehören zur Klasse der *Major Facilitator* Superfamilie (MFS, Transporterklasse 2.A.1). Sie bestehen in der Regel aus 12 Transmembranspannen (TM) mit N- und C-Terminus auf der intrazellulären Seite (Halestrap, 2012; Yan, 2015). FNTs werden mittlerweile als Transporterklasse 1.A.16 eingestuft (Saier, JR et al, 1999) und gehören somit zu der *Major Intrinsic Protein*-Superfamilie (Busch & Saier, JR, 2002), zu denen auch die Aquaporine gehören. Strukturell unterscheiden sich die FNTs stark von den MFS-Transportern.

Derzeit existieren fünf FNT Kristallstrukturen: von FocA aus *E. coli* (Wang et al, 2009), *Vibrio cholerae* (Waight et al, 2010) und *Salmonella typhimurium* (Lü et al, 2011), von NirC aus *Salmonella typhimurium* (Lü et al, 2012b) und FNT3/HSC aus *Clostridium difficile* (Czyzewski & Wang, 2012).

FNTs sind als symmetrische Homopentamere aufgebaut und weisen dabei einen Durchmesser von 80 Å sowie eine Höhe von etwa 50 Å auf (Wang et al, 2009; Falke et al, 2010). Eine zentrale hydrophobe Pore ist mit Lipiden gefüllt und dient nicht dem Transport, sondern der Stabilisierung der Pentamere in der Lipidmembran (Wang et al, 2009). Die einzelnen Protomere sind zueinander identisch, jedes Protomer besteht aus sechs Transmembranspannen mit beiden Termini auf der zytoplasmischen Seite. Die Transmembranspannen 1, 3, 4 und 6 bestehen jeweils aus einer durchgehenden α -Helix, während die Transmembranspannen 2 und 5 sich aus zwei α -Helices zusammensetzen. Die Halbhelices werden durch *loop*-Regionen verbunden, wodurch sich zwei Konstriktionen innerhalb der Pore bilden: Eine zytoplasmische Konstriktion durch die Verbindung der Transmembranspannen 2A und B über den Ω -*loop*, sowie eine extrazelluläre durch TM 5A und B über den sogenannten S-*loop* (Waight et al, 2010). Die Aminosäuresequenzen in diesen Bereichen liegen stark konserviert vor (Wang et al, 2009).

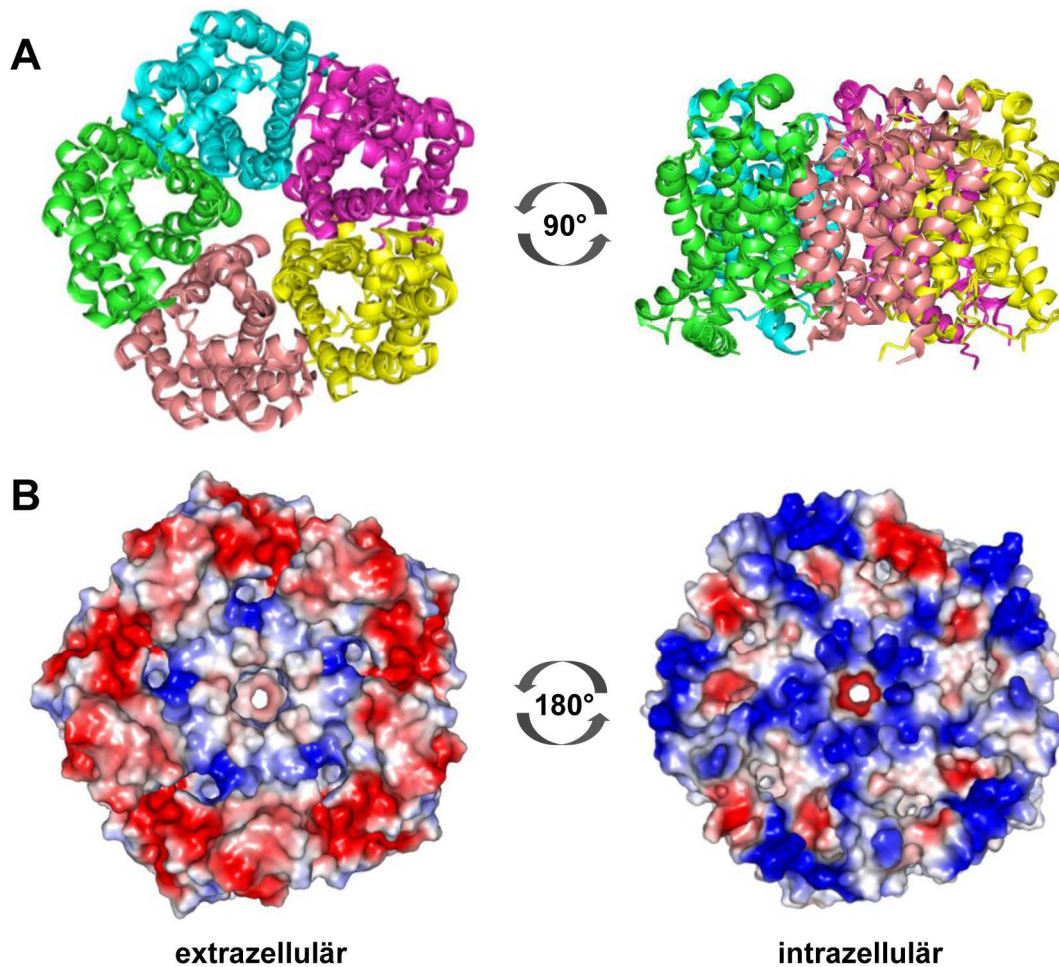


Abb. 1.4: Aufsicht, Seitenansicht und Elektrostatik des Pentamers vom Formiattransporter FocA aus *Salmonella typhimurium* (PDB # 3Q7K)

(A) Die zentrale Pore ist mit Lipiden gefüllt, um das Membranprotein in der Zellmembran zu stabilisieren. (B) Elektrostatik von FocA (blau: positive Ladung, rot: negative Ladung). Abbildungen erstellt mit Pymol[®].

In ihrer Struktur ähneln die FNTs stark der Aqua- und Glyceroporin-Familie (AQP) - diese Membranproteine sind permeabel für Wasser und kleine organische Moleküle (Walz et al, 1997, Agre et al, 2002; Stroud et al, 2003). AQPs besitzen ebenfalls sechs TMs, wobei TM2 und TM5 aus Halbhelices bestehen und durch *loops* verbunden sind. Beide Proteinfamilien zeigen eine Spiegelebene der Tertiärstruktur zwischen TM 3 und 4 (Abb. 1.5). Strukturen einzelner Monomere eines FNTs und AQPs können übereinander gelegt werden und weisen Abweichungen von nur 3 Å auf (Wang et al, 2009). In der Quartärstruktur unterscheiden sie sich dahingehend, dass AQPs als Tetramere aufgebaut sind (Agre et al, 2002). Obwohl beide Proteinfamilien eine starke strukturelle Ähnlichkeit besitzen, zeigen sie keine Sequenzhomologie und werden daher als strukturelle Mimikry bezeichnet (Wang et al, 2009; Waight et al, 2010; Rambow et al, 2014).

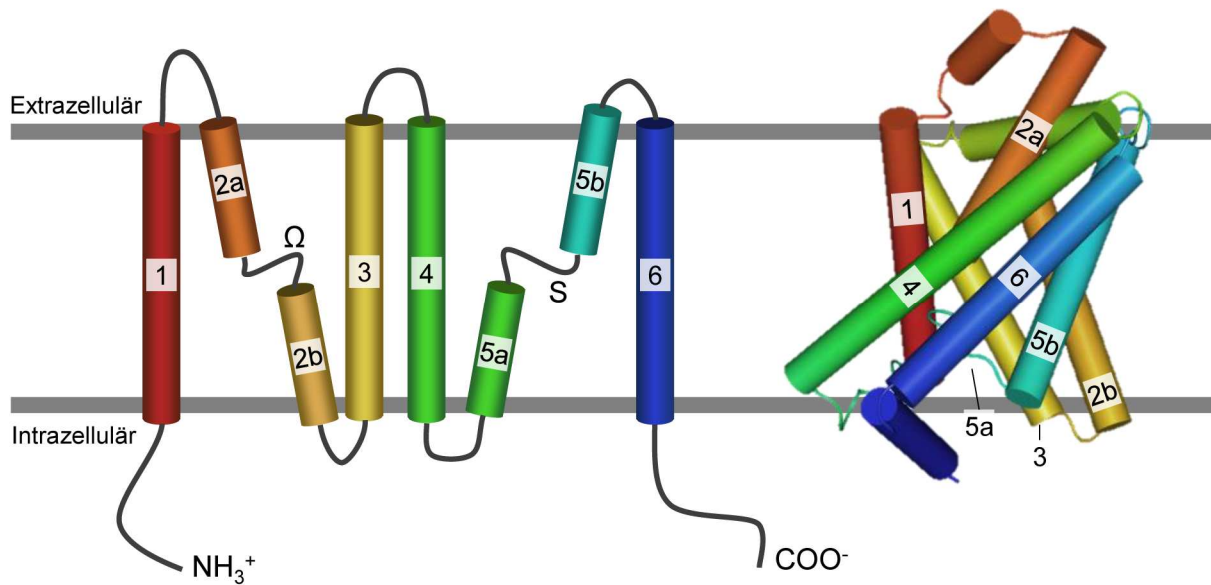


Abb. 1.5: Topologie eines FNT-Monomers

Links ist das Schema der Topologie eines FNT-Monomers dargestellt. Die Darstellung rechts zeigt FocA (PDB # 3KCU) in seiner gefalteten Form, Helices sind als Zylinder dargestellt. N- und C-Terminus liegen auf der zyttoplasmischen Seite; erstellt mit Pymol®.

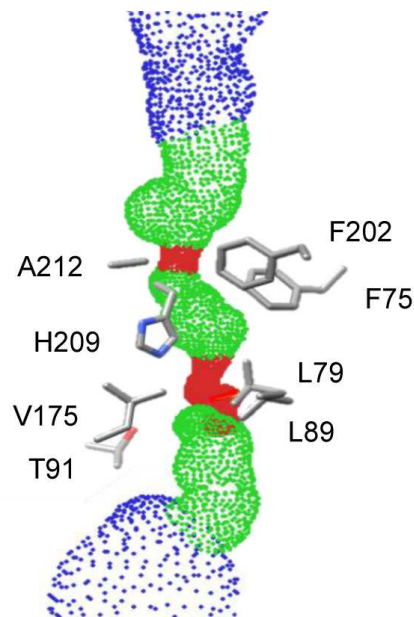


Abb. 1.6: Substrattransportpfad der FNTs

Die Radien entlang des Transportpfades wurden mit HOLE® berechnet (Smart et al, 1996). Rot sind wasserundurchlässige Stellen dargestellt, grün kann ein Wassermolekül enthalten. Die konstriktionsbildenden Aminosäuren sind mit Chimera® dargestellt, der Pfad mit VMD® visualisiert.

Entlang des Transportpfades sind einige hoch konservierte Aminosäuren angesiedelt (Wang et al, 2009). Die beiden Konstriktionen werden durch jeweils drei konservierte lipophile Aminosäuren gebildet (Abb. 1.6). Zwischen den beiden Konstriktionen liegt ein zentraler Hohlraum - dort befindet sich ein konserviertes Histidin, welches über eine Wasserstoffbrückenbindung ein Wassermolekül fixiert. Dieses wird ebenfalls durch ein konserviertes Threonin gebunden, welches sich im Bereich der zytoplasmischen Konstriktion befindet (Wang et al, 2009).

FNTs folgen der "*positive-inside*"-Regel des sekretorischen Proteineinbaus in Membranen. Diese besagt, dass sich positive geladene Regionen des Membranproteins im Zellinneren befinden (Heijne & Gavel, 1988; Beckwith, 2013). Dementsprechend zeigen auch alle bisher strukturell untersuchten FNTs eine positiv geladene Oberfläche auf der zytoplasmischen Seite, was im Einklang mit der elektrostatischen Anziehung der negativ geladenen Substrate steht (Lü et al, 2013).

Lü et al. beobachteten außerdem eine hohe Flexibilität des N-Terminus (Lü et al, 2011). In StFocA-Kristallen bei saurem pH-Wert zeigen Monomere verschiedene Ausrichtungen des N-Terminus – entweder liegt dieser ungeordnet vor oder es wird eine Helix gebildet, die sich vor den Poreneingang legen kann. Kristallstrukturen von NirC zeigen hingegen eine im Pentamer gleiche Anordnung des N-Terminus, welche den Poreneingang nicht verschließt (Lü et al, 2012b).

1.3 Substratselektivität

FNTs weisen ein breites Substratspektrum mit wenig Selektivität auf (Lü et al, 2013). Bisher ist der Transport von Monocarboxylaten wie Formiat, Acetat, L-Laktat, D-Laktat und Pyruvat nachgewiesen worden, aber auch anorganische Anionen wie Nitrit, Hydrogensulfid, Hypophosphit und Chlorid sind Substrate der FNTs. Bi- oder polyvalente Anionen sowie Kationen werden von den Transportern ausgeschlossen, ebenso Wasser (Wang et al, 2009; Lü et al, 2012a). Folglich besitzen FNTs einen Ladungsfilter, der nur die Leitfähigkeit von monovalenten Säuren bedingt (Lü et al, 2013). Diese Funktion wird den lipophilen Konstriktionen zugeschrieben, welche sowohl den extrazellulären als auch den zytoplasmischen Raum vom Transporter abschirmen. Die Kristallstrukturen zeigen, dass die lipophilen Konstriktionen zu eng sind, um Substrate passieren lassen zu können. Daher muss es innerhalb des Transportpfades zu leichten Konformationsänderungen kommen, die durch Erweitern der Engstellen die Passage erlauben (Lü et al, 2012a). Für die einzelnen Vertreter wurden bis jetzt unterschiedliche Substratspektren bestimmt, die in Tab. 1.1 zusammengefasst sind. Es stellt sich die Frage, ob die unterschiedlichen Substratspektren auf strukturelle Unterschiede zurückzuführen sind. FNTs besitzen eine schwache, pH-abhängige Substrataffinität im Bereich von 10-100 mM (Waight et al, 2010; Lü et al, 2012a; Wu et al, 2015).

Tab. 1.1: Substratspektren einzelner FNTs

x: Leitfähigkeit wurde nachgewiesen, 0: keine Leitfähigkeit, n.t.: Leitfähigkeit nicht getestet

	FocA	NirC	HSC	<i>Pf</i> FNT
Formiat	x	x	x	x
Acetat	x	n. t.	n. t.	x
Pyruvat	x	n. t.	n. t.	x
Laktat	x	n. t.	n. t.	x
Nitrit	x	x	x	n. t.
Nitrat	0	x	n. t.	n. t.
Hydrogensulfid	n. t.	n. t.	x	n. t.
Hypophosphit	x	n. t.	n. t.	n. t.
Chlorid	x	n. t.	x	n. t.
Quelle:	(Suppmann & Sawers, 1994; Lü et al, 2012a)	(Lü et al, 2012b; Rycovska et al, 2012)	(Czyzewski & Wang, 2012)	(Wu et al, 2015)

Aufgrund ihrer strukturellen und mechanistischen Unterschiede zu den MCTs und ihrer zum Teil zentralen Rolle im Energiemetabolismus bestimmter Mikroorganismen stellen FNTs valide Wirkstoffziele dar (Wu et al, 2015; Das et al, 2009).

Bekannte Inhibitoren der FNTs sind Phloretin, Furosemid und Zimtsäurederivate, welche jedoch alle IC₅₀-Werte im millimolaren Bereich zeigen (Cranmer et al, 1995; Elliott et al, 2001; Wu et al, 2015; Marchetti et al, 2015). Vor kurzem haben wir durch das Screening einer Substanzsammlung mit Antimalaria-Wirkung (*malaria box*) einen neuen *Pf*FNT-Inhibitor MMV007839 mit nanomolarer Affinität identifiziert (Golldack et al, 2017; Hapuarachchi et al, 2017). Chemisch handelt es sich um ein Hemiketal, welches in seiner geschlossenen lipophilen Form die Membranen von Erythrozyt und Parasit passieren kann; die offene Form, eine vinyloge Carbonsäure, bindet an der zytoplasmischen Seite des Transportes (Abb. 1.7). Durch die kontinuierliche Inkubation von *Plasmodium falciparum*-Kulturen mit der dreifachen IC₅₀-Konzentration des Inhibitors sind jedoch nach kurzer Zeit resistente Parasitenkulturen entstanden, welche einen Austausch von Glycin107 zu Serin im zytoplasmischen Eingang aufwiesen. G107 befindet sich an einer wichtigen Position innerhalb des Transporters: Im L2-loop liegt es direkt neben dem konservierten Threonin der zytoplasmischen Konstriktion, welches eine essentielle Funktion für die Struktur des Transportpfades besitzt.

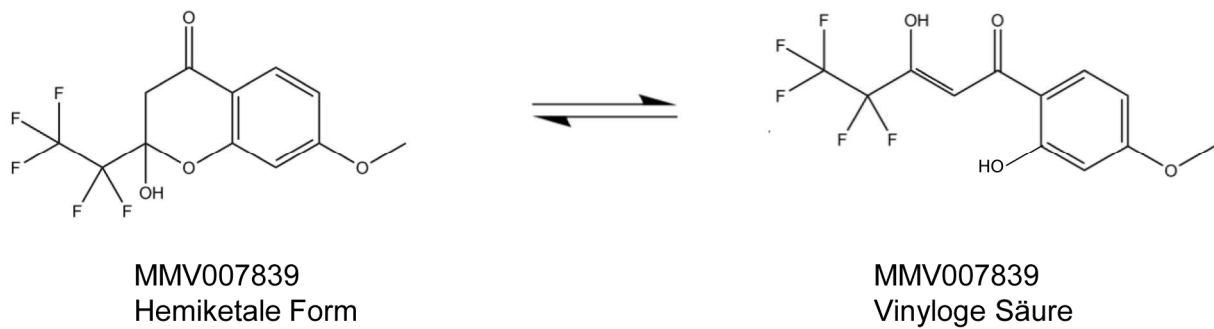


Abb. 1.7 Struktur von MMV007838, Inhibitorleitsubstanz von *PfFNT*, nach (Golldack et al, 2017)
Dargestellt sind die hemiketale sowie die offene Form des Inhibitors. Die Strukturformeln wurden mit ChemDraw[®] erstellt.

1.4 Transportmechanismus der FNTs

1.4.1 Bisherige experimentelle Daten

Aufgrund der beiden lipophilen Engstellen innerhalb des Transportpfades der FNTs stellt sich die Frage, wie negativ geladene Substrate wie Formiat diese passieren können. Um dies zu klären, wurden bereits mehrere Untersuchungen durchgeführt.

Erste Mutationsanalysen von FocA haben die Rollen der lipophilen Konstriktionen, des zentralen Histidins und Threonins sowie des N-Terminus in einem Formiat-abhängigen β -Galaktosidase-Aktivitätsassay in *E. coli* untersucht (Hunger et al, 2014). Dabei ist eine entscheidende Rolle dem zentralen Histidin und Threonin sowie einer potentiellen Salzbrückentriade K156-E208-N213 im periplasmischen Poreneingang zugeschrieben worden. Funktionelle Details können durch diesen Assay jedoch nicht spezifiziert werden.

Proteoliposomen mit FocA zeigen in Lichtstreuungsexperimenten Formiatleitfähigkeit, sind jedoch undurchlässig für Wasser (Wang et al, 2009). *PfFNT* zeigt bei dieser Methode ebenfalls Formiat-, Acetat- und Laktattransport (Holm-Bertelsen et al, 2016).

Bei elektrophysiologischen Messungen wird der Transport von Ladungen über die Membran gemessen. Gereinigtes FocA wurde in *planar lipid bilayer*-Membranen eingebaut und ein Formiatgradient von 200/20 mM bei neutralem pH aufgebaut, was zu einem Stromfluss führte. Wurde das Medium auf pH 5 angesäuert, war kein Strom mehr messbar (Lü et al, 2011). Weiterführende Experimente zeigten eine rapide Veränderung der Leitfähigkeit zwischen pH 5,6 und 5,8 (Lü et al,

2012a), bei der die Leitfähigkeit im aziden pH-Bereich verschwand. Elektrophysiologische Messungen von NirC hingegen zeigten diese pH-Abhängigkeit nicht (Lü et al, 2012b). Dieses Verhalten wurde damit erklärt, dass über den N-Terminus ein *gating*-Mechanismus vorliegt: Im aziden pH-Bereich läge sich bei FocA der N-Terminus vor die Transportpore, sodass kein Transport möglich sei.

Mit Aufnahmemessungen von ^{14}C -radioaktiv markierten Substraten können quantitative Aussagen über die aufgenommene Substratmenge unabhängig von der Ladungsspezies des Substrates getroffen werden. In Proteoliposomen mit *EcFocA* oder HSC konnte die Aufnahme von ^{14}C -Formiat bei neutralem pH-Wert nachgewiesen werden (Wang et al, 2009; Czyzewski & Wang, 2012), ebenso die Substrataufnahme via *PfFNT* in Oozyten (Marchetti et al, 2015; Hapuarachchi et al, 2017). Durch die Untersuchung der Substrataufnahme in *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)-Zellen konnte der plasmodiale Laktattransporter *PfFNT* charakterisiert werden (Wu et al, 2015).

Mehrere Studien zeigen, dass *Plasmodium*-Parasiten Laktat in einem Symport mit Protonen transportieren (Kanaani & Ginsburg, 1991; Cranmer et al, 1995; Elliott et al, 2001; Hapuarachchi et al, 2017). Aufnahmestudien von ^{14}C -L-Laktat via *PfFNT* in *S. cerevisiae*-Zellen zeigen steigende Aufnahmeraten im aziden Bereich, die ihr Maximum im Bereich des Substrat- pK_s von 3,8 haben, bei azideren Bedingungen sinkt die Aufnahmerate erneut, sodass eine glockenförmige Kurve der pH-abhängigen Aufnahme entsteht (Wu et al, 2015). Nach Zugabe von Protonophoren, welche den Protonengradienten über die Membran zerstören, ist kein Laktattransport via *PfFNT* mehr vorhanden. Ebenfalls kann eine Protonenaufnahme via *PfFNT* durch Alkalisierung des äußeren Mediums nach Laktatzugabe detektiert werden. Dies spricht für einen Substrat-Protonensymport. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu den elektrophysiologischen Messungen, die im Aziden einen Transportverlust zeigten.

1.4.2 Theoretische Modelle

FocA wurde außerdem mittels molekulardynamischer Simulationen untersucht (Feng et al, 2012; Lv et al, 2013). Feng et al. haben vor allem das potentielle *gating* durch den N-Terminus sowie die Rolle des zentralen Histidins H209 analysiert. Die Bewegungen des N-Terminus innerhalb eines Pentamers wurden mit protoniertem und unprotoniertem Histidin untersucht. Über die Lage des N-Terminus wurde der Zustand eines geöffneten und geschlossenen Kanals definiert. Dabei zeigten molekulardynamische Simulationen bei neutralem pH zwei geöffnete intrazelluläre Poreneingänge, während ein niedriger pH-Wert nur ein geöffnetes Protomer aufwies. Weiterhin wurden die Konstriktionen der Transportpore im Zustand des protonierten zentralen Histidins enger und starrer,

woraus geschlossen wurde, dass ein pH-abhängiges *gating* im aziden Zustand den Transporter verschließt.

Lv et al. zeigten hingegen, dass die Position des N-Terminus keinen Einfluss auf die Formiat-permeabilität haben kann und es somit keine offenen oder geschlossenen Zustände gibt. Es wurde gezeigt, dass Ameisensäure unabhängig vom Protonierungszustand des zentralen Histidins die Transportpore passieren kann. Anionen konnten jedoch nur bei einem protonierten Histidin die Konstrictionen überwinden. Es wird ein Formiatexport bei neutralem pH (und protoniertem Histidin) sowie die Ameisensäure-Permeation über den FNT-Kanal in die Zelle bei niedrigem pH-Wert vorgeschlagen (Lv et al, 2013).

Basierend auf theoretischen Überlegungen und experimentellen Beobachtungen wurde daher unter anderem folgender Mechanismus postuliert (Lü et al, 2013, Abb. 1.8):

1. Anionen werden vom zentralen geladenen Histidin angezogen und innerhalb des Transporters protoniert, sodass diese ungeladen die beiden lipophilen Engstellen passieren können. Hat ein ungeladenes Substratmolekül die zyttoplasmische Konstriktion passiert, wird das Proton über ein fixiertes Wassermolekül und das Ω -Threonin an das Histidin zurückübertragen, es findet also ein sogenannter Protonenstaffellauf („*proton relay*“) statt.
2. Im sauren Medium werden Protonen ebenfalls vom Histidin auf das Substratanion übertragen, dieses jedoch aus der Umgebung erneut protoniert, sodass das Substrat im Cytosol dissoziiert. Beide Theorien geben dem konservierten Histidin eine zentrale Bedeutung für die Substratprotonierung (Lü et al, 2013).

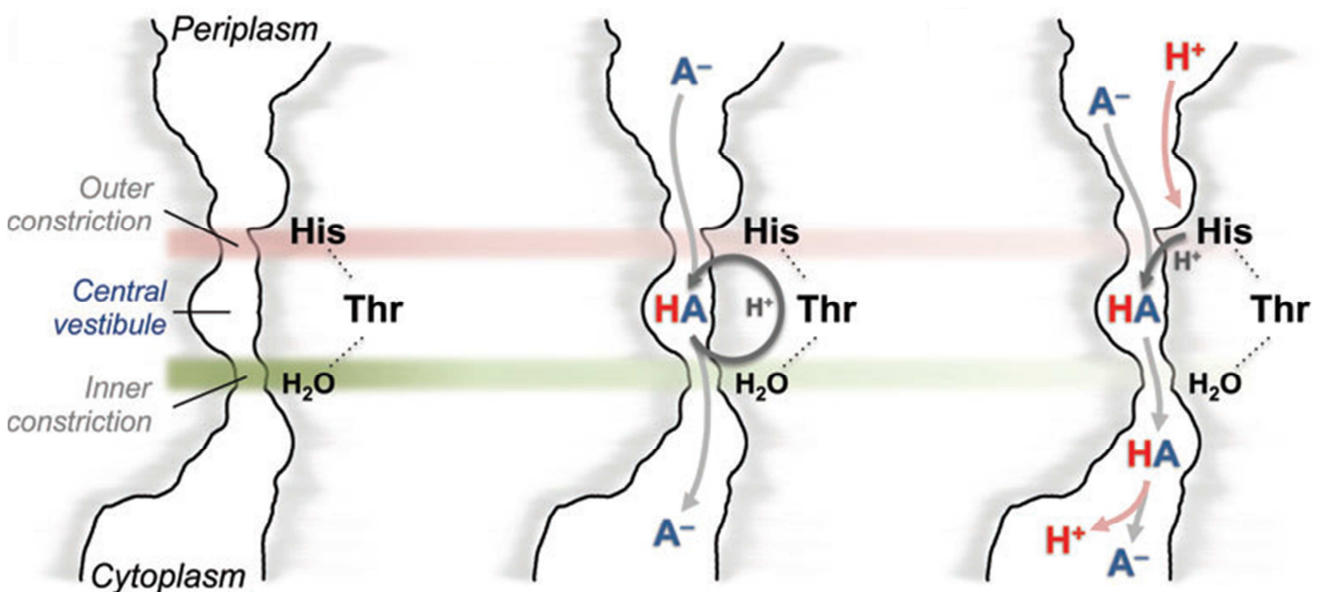


Abb. 1.8: Postulierter Transportmechanismus der FNTs, entnommen aus (Lü et al, 2013)

Das postulierte Transportmodell (Abb. 1.8) bildet das zentrale Histidin recht suggestiv auf Höhe der oberen lipophilen Konstriktion ab. Bei genauer Betrachtung der Kristallstrukturen ist jedoch ersichtlich, dass sich die Imidazol-Seitenkette des Histidins zwischen den lipophilen Engstellen befindet und sterisch nicht in der Lage ist, nach oben oder unten zu klappen, um Anionen zu protonieren. Diese müssten also zunächst die erste lipophile Engstelle überwinden, um vom Histidin protoniert zu werden.

Es ist außerdem noch nicht abschließend geklärt, ob es sich bei den FNTs um Kanäle oder Transporter handelt. Das erste Mitglied der Familie wurde als Kanal definiert (das C in FocA steht für *channel*) (Suppmann & Sawers, 1994), die komplette Proteinfamilie jedoch später als Transporter klassifiziert (Saier, JR et al, 1999).

Transporter sind im Gegensatz zu Kanälen in der Lage, Substrate entgegen des Gradienten über eine Membran zu transportieren. Primär aktive Transporter benötigen dafür Energie, die durch Photonen oder durch eine chemische Reaktion wie der ATP-Hydrolyse bereitgestellt wird (Yan, 2015). Sekundär aktive Transporter, zu denen auch die Monocarboxylattransporter gehören, nutzen das elektrochemische Potential eines kotransportierten Ions oder Solutes (Symporter, Antiporter). Uniporter katalysieren die Diffusion eines Substrates entlang des elektrochemischen Gradienten und werden als passive Transporter bezeichnet. Sekundär aktive Transporter folgen dem „*alternating-access*“-Mechanismus, der besagt, dass die substratbindende Seite entweder auf der extrazellulären oder der cytoplasmischen Seite liegt und es zu mindestens zwei Konformationsänderungen kommen muss, um ein Substrat über die Membran zu transportieren (Drew & Boudker, 2016). Außerdem zeigen sekundär aktive Transporter eine hohe Substrataffinität (Waight et al, 2010; Wu et al, 2015). Kanäle hingegen besitzen eine substratleitende zentrale Pore, eine niedrige Substrataffinität und zeigen keinen aktiven Symportmechanismus (Unwin, 1989; Rycovska et al, 2012). Somit ist derzeit keine Einordnung der FNTs in die Kanal-Transporter-Klassifizierung möglich (Lü et al, 2013).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Viele Fragen bezüglich des Transportmechanismus und der Substratselektivität von FNTs sind ungeklärt oder zeigen widersprüchliche Ergebnisse. Vor allem die zentrale Frage, wie Anionen die lipophilen Engstellen passieren können, konnte mit den derzeitigen experimentellen Ergebnissen noch nicht beantwortet werden. Diese Arbeit verfolgt das Ziel, den Mechanismus und die Substratselektivität experimentell und mit bioinformatischen Methoden zu charakterisieren. Durch strukturelle Auswertung und gezielte Mutation soll versucht werden, einen potentiellen Substratselektivitätsfilter zu identifizieren und zu charakterisieren, mit besonderem Blick auf

Unterschiede zwischen eukaryotischen und prokaryotischen FNTs. Die aufgetretene Resistenz von plasmodialen Parasiten nach Inkubation mit dem nanomolaren Inhibitor MMV007839 soll in *S.cerevisiae* nachgestellt und die Auswirkung auf das Transportverhalten charakterisiert werden, um weiterführende Inhibitorstudien durchführen zu können. Durch Mutationsanalysen sollen die am FNT-Transportmechanismus beteiligten Aminosäuren identifiziert und deren Rolle spezifiziert werden. Auch die Beteiligung des N-Terminus an einem möglichen *gating* Mechanismus ist zu klären. Im Mittelpunkt der Arbeit steht die Aufklärung, ob und wie es im Rahmen des Transports zur Protonierung des Substrates kommt. Dafür werden der Einfluss des Protonengradienten, ein möglicher Protonensymport, die Anzahl der Protonierungsschritte und weitere Parameter bestimmt. Abschließend soll ein auf diesen neuen Erkenntnissen beruhendes Transportmodell aufgestellt und der Mechanismus klassifiziert werden.

2 Material

2.1 Enzyme, Chemikalien, Kits, Material

ABCR, Karlsruhe

Natriumfluoracetat

AppliChem, Darmstadt

Tween 20, Natriumlaurylsulfat, Natrium-L-laktat

Becton, Dickinson and Company, Heidelberg

Difco™ Yeast Nitrogen Base w/o amino acids, Bacto™ Yeast Extract, Bacto™ Trypton, Bacto™ Pepto

Beckman Coulter, Krefeld

Genome™ LabDTCS Quick Start Kit

Bio-Rad, München

Clarity Western ECL Blotting Substrate, Bio-Rad Protein Assay

GE Healthcare, Freiburg

Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System, Amersham™ Hybond™ 0.45 PVDF, Whatman Chromatography Paper 3MM

Genaxxon BioScience, Ulm

Ampicillin, TEMED, Agarose LE

J.T. Baker, München

Ethanol, Methanol, Isopropanol, Essigsäure, Salzsäure, Schwefelsäure

Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig

¹⁴C-Natriumformiat, ¹⁴C-Natrium-L-laktat, ¹⁴C-Natriumacetat, ¹⁴C-Natriumfluoracetat

MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich

Ethidiumbromid

New England BioLabs GmbH, Frankfurt

Agar bacteriological

Oxoid, Basingstoke, USA

Oxoid Agar

Peqlab, Erlangen

PeqGOLD Prestained Protein Marker III

Promega, Mannheim

SV Minipreps DNA purification System

Roth, Karlsruhe

2-Desoxy-D-Glucose, Deuteriumoxid, EDTA, Tris-Acetat, Glycerol, LB-Medium, LB-Agar, Pepton Hefeextrakt, Glucose, Ammoniumsulfat, Natriumchlorid, Glycin, MES, HEPES, Natriumacetat, Citronensäure, Natriumdihydrogenphosphat, alle weiteren nicht aufgeführten Chemikalien

Sigma Aldrich, München

Membranfilter Nylon (0.45µm, 25 mm), Natriumformiat, Lithiumacetat, Magnesiumacetat, Polyoxyethylenglycol 8000, L-Histidin, L-Isoleucin, Adenin, L-Tryptophan, Coomassie G250, IPTG, *Glassbeads* (säuregewaschen), Natriumgluconat, 2,4-Dinitrophenol, Carbonylcyanid-*m*-chloro-phenylhydrazon

Süd-Laborbedarf, Gauting

Hi Yield® Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit

Thermo Fisher Scientific, Schwerte

Restriktionsendonukleasen, dNTPs, T4-DNA-Ligase

VWR International GmbH, Hannover

Szintillations-Fläschchen Snaptwist®, Glasfaserrundfilter GF/C 25 mm

Zinsser Analytics, Frankfurt

Szintillation Cocktail Mix Quicksafe A

2.2 Geräte

Beckman Coulter, Krefeld

Optima™ XL-80K Ultrazentrifuge, Rotor 50.2 Ti
DNA Sequencer CEQ™ 8000

Bandelin, Berlin

Sonopuls mini20

Bio-Rad, München

PowerPac 200, Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell

Elysia & Raytest GmbH, Straubenhardt

Gel-Dokumentationssystem IDA

Eppendorf AG, Hamburg

Bio Photometer

Hereaus Holding, Hanau

Biofuge Pico, Kelvitron T, Multifuge 1S-R Centrifuge

Herolab GmbH, Wiesloch

UVT-20 S/M (UV Transilluminator)

IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen

Ikamag® Ret-GS

Infors HT, Bottmingen, Schweiz

Minitron

New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen

Innova U535 Upright Freezer

Perkin-Elmer, Langenfeld

TRI-CARB 2000TR Liquid Szintillation Analyzer

PeqLab, Erlangen

Perfect Spin 24R *refrigerated microcentrifuge*, Primus PCR-Blöcke, SDS-Gelgießstand und Laufkammer

Roche Diagnostics, Mannheim

Lumi-Imager™ F1

Savant Instruments, Farmingdale, USA

Vakuumentrifuge DNA SpeedVac® DNA 110

Scientific Industries, Bohemia, USA

Vortex®-Genie 2

Schott Instruments, Mainz

Digital-Labor-pH-Meter Lab 850

WTW GmbH, Weilheim

SenTix 950 pH Elektrode

Multi 9310 pH Meter

2.3 Plasmide

Die Erstellung der Plasmidkarten erfolgte mithilfe der Plasmapper Software (Dong et al, 2004).

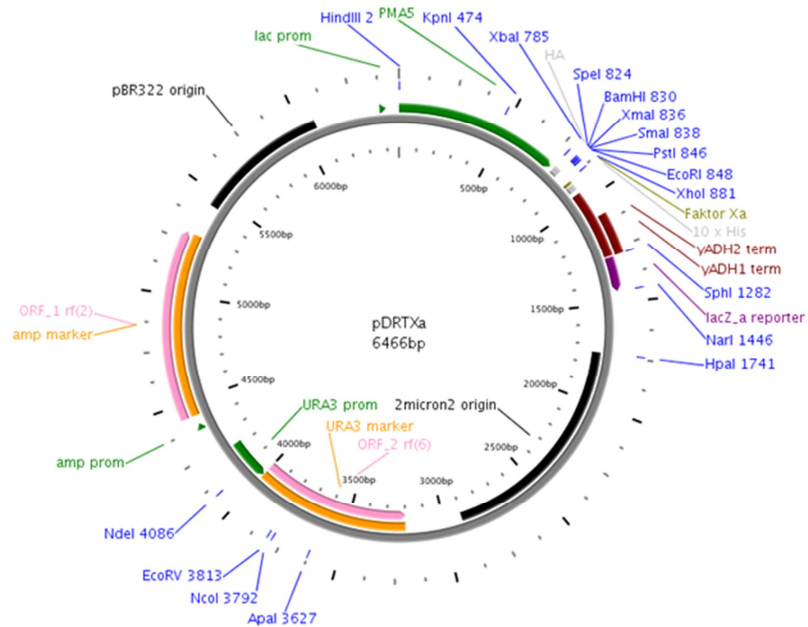


Abb. 2.1: pDRTXa

Hefe-*high copy*-Vektor pDR196, welcher ein N-terminales HA-tag sowie einen C-terminalen 10x-His-tag besitzt. Der His-tag kann durch eine Faktor Xa Schnittstelle entfernt werden.

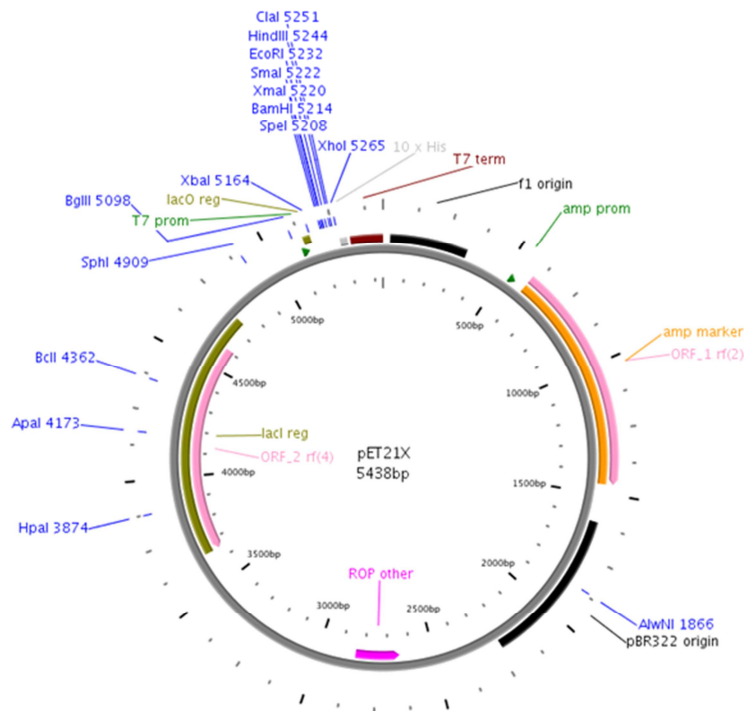


Abb. 2.2: pET21X

E. coli Vektor zur gezielten Genüberexpression mit T7 Promotor und C-terminalen 10x-His-tag.

2.4 Kodierende DNA-Sequenzen

Name	Beschreibung	Gen-ID
<i>EcFocA</i>	Formiat-Nitrit-Transporter aus <i>E. coli</i>	945513
<i>PfFNT</i>	Formiat-Nitrit-Transporter aus <i>Plasmodium falciparum</i>	814480
<i>EcNirC</i>	Nitrit-Transporter aus <i>E. coli</i>	2847757
<i>BbFNT</i>	Formiat-Nitrit-Transporter aus <i>Babesia bovis</i>	5476906

2.5 Oligonukleotide (*primer*)

Mutations-*primer*

Bezeichnung	Sequenz
<i>EcFocA_F49A_fw</i>	TTC ATC TCA ATC GCA <u>GCC</u> GTC TTC TAT ATC ACA
<i>EcFocA_F49A_rv</i>	TGC GAT TGA GAT GAA AAC ACC GGC GGT AAT
<i>EcFocA_Y52S_fw</i>	ATC GCA TTC GTC TTC <u>TCT</u> ATC ACA GCA ACC ACT
<i>EcFocA_Y52S_rv</i>	GAA GAC GAA TGC GAT TGA GAT GAA AAC ACC
<i>EcFocA_V203A_fw</i>	GTC GCG ATG TTT <u>GCT</u> GCC AGC GGT TTT
<i>EcFocA_V203A_rv</i>	AAA CAT CGC GAC CGG CAG CAC CAT AAT GAA
<i>EcFocA_T91V_fw</i>	GGA GCC GAT CTC TTT <u>GTT</u> TCC ACC GTG TTG ATT
<i>EcFocA_T91S_fw</i>	GGA GCC GAT CTC TTT <u>TCT</u> TCC ACC GTG TTG ATT
<i>EcFocA_T91X_rv</i>	AAA GAG ATC GGC TCC GCA GAC AAC ACA AAG
<i>EcFocA_H209N_fw</i>	GCC AGC GGT TTT GAG <u>AAC</u> AGT ATC GCA AAC ATG
<i>EcFocA_H209X_rv</i>	CTC AAA ACC GCT GGC AAC AAA CAT CGC GAC
<i>EcFocA_K156C_fw</i>	CAA ACC GCC GAC CAC <u>TGC</u> GTG CAC CAT ACT TTT
<i>EcFocA_K156A_fw</i>	CAA ACC GCC GAC CAC <u>GCA</u> GTG CAC CAT ACT TTT
<i>EcFocA_K156M_fw</i>	CAA ACC GCC GAC CAC <u>ATG</u> GTG CAC CAT ACT TTT
<i>EcFocA_K156X_rv</i>	GTG GTC GGC GGT TGT TAG GAC GTT TAG TCC

Material

EcFocA_E208Q_fw	GTT GCC AGC GGT TTT <u>CAG</u> CAC AGT ATC GCA AAC
EcFocA_E208L_fw	GTT GCC AGC GGT TTT <u>CTG</u> CAC AGT ATC GCA AAC
EcFocA_E208X_rv	AAA ACC GCT GGC AAC AAA CAT CGC GAC CGG
PfFNT_A58V_fw	TTC GTA GGC CTG TGT <u>GTA</u> CAT GCG TCA GGA ATC
PfFNT_A58L_fw	TTC GTA GGC CTG TGT <u>CTA</u> CAT GCG TCA GGA ATC
PfFNT_A58F_fw	TTC GTA GGC CTG TGT <u>TTC</u> CAT GCG TCA GGA ATC
PfFNT_A58X_rv	ACA CAG GCC TAC GAA CAT CCC TGC CAG AAT
PfFNT_S61Y_fw	CTG TGT GCA CAT GCG <u>TAC</u> GGA ATC GCG GGT GGG
PfFNT_S61X_rv	CGC ATG TGC ACA CAG GCC TAC GAA CAT CCC
PfFNT_F94L_fw	ACA TTT CCG ATA GCA <u>TTG</u> ATG TGC ATC ATC TGT
PfFNT_F94L_rv	TGC TAT CGG AAA TGT AAA GCC GTA CAC AAA
PfFNT_A224V_fw	GCA GTT TAT GCC TTT <u>GTG</u> ATT GCC GGC TAT GAG
PfFNT_A224V_rv	AAA GGC ATA AAC TGC AAA GAA CAC AGA AAA
PfFNT_T106S_fw	GGT TCG GAT TTG TTT <u>AGC</u> GGT AAT ACA CTA GCG
PfFNT_T106V_fw	GGT TCG GAT TTG TTT <u>GTC</u> GGT AAT ACA CTA GCG
PfFNT_T106X_rv	AAA CAA ATC CGA ACC GGT ACA GAT GAT GCA
PfFNT_H230Q_fw	ATT GCC GGC TAT GAG <u>CAG</u> ATC ATA GCC AAC ATC
PfFNT_H230A_fw	ATT GCC GGC TAT GAG <u>GCT</u> ATC ATA GCC AAC ATC
PfFNT_H230D_fw	ATT GCC GGC TAT GAG <u>GAT</u> ATC ATA GCC AAC ATC
PfFNT_H230X_rv	CTC ATA GCC GGC AAT CGC AAA GGC ATA AAC
PfFNT_K177C_fw	GAT ATC GCA GAG AAG <u>TGC</u> GTT ACA CAT ACA TTT
PfFNT_K177X_rv	CTT CTC TGC GAT ATC ATT CAG AAA CTG GAA
PfFNT_E229Q_fw	GCG ATT GCC GGA TAT <u>CAG</u> CAT ATC ATA GCC AAC
PfFNT_E229L_fw	GCG ATT GCC GGA TAT <u>CTG</u> CAT ATC ATA GCC AAC
PfFNT_E229X_rv	ATA GCC GGC AAT CGC AAA GGC ATA AAC TGC
EcFocA_K17A_fw	CCT GCT GCA ATG GCC <u>GCA</u> GTG GCC GAA GAG GCG
EcFocA_K17X_rv	GGC CAT TGC AGC AGG AAG TAA AAG ATC AAA

Material

EcFocA_K26A_fw	GAG GCG GGT GTC TAT <u>GCA</u> GCA ACG AAA CAT CCG
EcFocA_K26X_rv	ATA GAC ACC CGC CTC TTC GGC CAC TTT GGC
EcFocA_K29A_fw	GTC TAT AAA GCA ACG <u>GCA</u> CAT CCG CTT AAG ACT
EcFocA_K29X_rv	CGT TGC TTT ATA GAC ACC CGC CTC TTC GGC
PfFNT_K16A_fw	GAC CCT GTT TCT ATC <u>GCA</u> AGC GTG TGC GGA GGG
PfFNT_K16X_rv	GAT AGA AAC AGG GTC AAG AAC ATA TTT CGA
PfFNT_K33A_fw	TGT GTT GAG TAT GGC <u>GCG</u> AAG AAA GCC CAT TAC
PfFNT_K33X_rv	GCC ATA CTC AAC ACA ACG GAT ATA GCT TTC
PfFNT_K34A_fw	GTT GAG TAT GGC AAG <u>GCG</u> AAA GCC CAT TAC AGT
PfFNT_K34X_rv	CTT GCC ATA CTC AAC ACA ACG GAT ATA GCT
PfFNT_K35A_fw	GAG TAT GGC AAG AAG <u>GCA</u> GCC CAT TAC AGT AAT
PfFNT_K35X_rv	CTT CTT GCC ATA CTC AAC ACA ACG GAT ATA
PfFNT_G107S_fw	TCG GAT TTG TTT ACC <u>AGT</u> AAT ACA CTA GCG GTC
PfFNT_G107A_fw	TCG GAT TTG TTT ACC <u>GCT</u> AAT ACA CTA GCG GTC
PfFNT_G107C_fw	TCG GAT TTG TTT ACC <u>TGT</u> AAT ACA CTA GCG GTC
PfFNT_G107V_fw	TCG GAT TTG TTT ACC <u>GTT</u> AAT ACA CTA GCG GTC
PfFNT_G107X_rv	GGT AAA CAA ATC CGA ACC GGT ACA GAT GAT
EcFocA_H155A_fw	CTA CAA ACC GCC GAC <u>GCC</u> AAA GTG CAC CAT ACT
EcFocA_H155X_rv	GTC GGC GGT TTG TAG GAC GTT TAG TCC CCA
EcFocA_H159N_fw	GAC CAC AAA GTG CAC <u>AAT</u> ACT TTT ATT GAG GCC
EcFocA_H159X_rv	GTG CAC TTT GTG GTC GGC GGT TTG TAG GAC
PfFNT_F90C_fw	GTG TAC GGC TTT ACA <u>TGT</u> CCG ATA GCA TTC ATG
PfFNT_F90X_rv	TGT AAA GCC GTA CAC AAA GAC ACT CAT AGA

Sequenzier-primer

Bezeichnung	Sequenz	Sinn
ADH3	CATAAATCATAAGAAATTCGC	as
PMA 5	CTCTCTTTTATACACACATTC	s
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	s
T7_Term_pet21X_	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	as
FocA_270_fw	TACTTCCACCGTGTTGATTGT	s
OptPpFNT_396_rv_seq	TCATAACCCGGAGATAGTCTAA	as
OPpPpFNT_763_fw_seq	CCTATATTA AAAACCTGCTGCC	s

Klonierungs-primer

Bezeichnung	Sequenz	Sinn
EcFocA_ΔN1-29_fw	gcatctagaATGCATCCGCTTAAGACTTTC	s
EcFocA_ΔN1-19_fw	atatctagaATGGAAGAGGCGGGTGTCTATA	s
EcFocA_ΔN1-19_K26A_fw	tctagaATGGAAGAGGCGGGTGTCTATG <u>CAGCA</u>	s
EcFocA_ΔN1-19_K29A_fw	tctagaATGGAAGAGGCGGGTGTCTATAAAGCAACG <u>GCA</u>	s
EcFocA_ΔN_rv	ATTctcgagATGGTGGTCGTTTTCACGC	as

2.6 E. coli-Stämme

Name	Genotyp
BL21 pRep4	F- <i>ompT hsdSB</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pRep4 (neo)
DH5α	F- ϕ 80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1</i>

2.7 S. cerevisiae-Stämme

Name	Genotyp	Quelle
W303-1A Δ <i>jen1</i> Δ <i>ady2</i>	Δ <i>jen1</i> Δ <i>ady2</i> (MATa, <i>can1-100</i> , <i>ade2-1_{oc}</i> , <i>his3-11-15</i> , <i>leu2-3,-112</i> , <i>trp1-1-1</i> , <i>ura3-1</i> , <i>jen1::kanMX4</i> , <i>ady2::hphMX4</i>)	M. Casal

2.8 Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung
Penta His	monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen 5 x Histidin gerichtet (Quiagen)	1 : 5000
HA 12CA5	monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen eine Teilsequenz des Hämagglutinins (YPYDVPDYA) gerichtet (Roche)	1 : 5000
anti-Maus (Sekundärantikörper)	polyklonaler Antikörper aus der Ziege gegen die Seitenkette des IgG der Maus, konjugiert mit Meerrettichperoxidase (Jackson Immuno Research)	1 : 5000

2.9 Puffer, Medien, Lösungen

2.9.1 Molekularbiologie

Alle in diesem Kapitel aufgeführten Nährmedien wurden nach der Herstellung autoklaviert.

Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer

40 mM Tris-Acetat, pH 8,0
1 mM EDTA

10 x Probenpuffer Orange G

0,4 % Orange G
30 % Glycerol
100 mM EDTA

Ethidiumbromid (10 mg ml⁻¹)

1 Tablette Ethidiumbromid
10 ml *Aqua bidest.*

E. coli-Medien

LB-Medium

20 g LB-Medium (Lennox)
1 l *Aqua bidest.*

gegebenenfalls Ampicillin 100 µg ml⁻¹
Kanamycin 40 µg ml⁻¹

LB-Agar

35 g LB-Agar
1 l *Aqua bidest.*

S. cerevisiae-Medien

YPD-Medium

20 g Pepton
10 g Hefeextrakt
20 g Glucose
ad 1 l *Aqua bidest.*

YPD-Platten

20 g Oxoid Agar
1 l YPD

SD-Medium

1,7 g YNB
5 g Ammoniumsulfat
20 g Glucose
ad 1 l *Aqua bidest.*, pH 5,6

SD-AHLW-Medium

Nach dem Abkühlen des SD-Mediums
wurde hinzugefügt:
25 mg ml⁻¹ Adenin
20 mg ml⁻¹ L-Histidin
100 mg ml⁻¹ L-Leucin
10 mg ml⁻¹ L-Tryptophan

SD-AHLW-Platten

20 g Oxoid Agar
1 l SD-Medium
nach Abkühlen auf ca. 60 °C:
25 mg ml⁻¹ Adenin
20 mg ml⁻¹ L-Histidin
100 mg ml⁻¹ L-Leucin
10 mg ml⁻¹ L-Tryptophan

2.9.2 Proteinchemie

Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus *S. cerevisiae*

Puffer B

25 mM TRIS-HCl pH 7,5
5 mM EDTA

Puffer M

100 mM Natriumphosphat pH 8,0
50 mM Natriumchlorid

Zellaufschluss *E. coli*

Zellysepuffer

50 mM TRIS-HCl pH 8,0
500 mM NaCl
10 % Glycerol

SDS-PAGE

Sammelgelpuffer 4 x

0,5 M TRIS, pH 6,8
0,4 % SDS

Trenngelpuffer 4 x

1,5 M TRIS, pH 8,8
0,4 % SDS

SDS-Ladepuffer 4 x

250 mM TRIS-HCl, pH 6,8
40 % Glycerol
0,02 % Bromphenolblau
8 % SDS
400 mM DTT

Material

Kathodenpuffer

192 mM	Glycin
25 mM	TRIS-HCl, pH 8,2-8,6
0,1 %	SDS

Entfärbelösung

10 %	Eisessig
30 %	Ethanol

Western Blot

Transferpuffer 5 x

5 mM	TRIS, pH 8,3
38,4 mM	Glycin
0,0075 %	SDS ad 1 l
20 %	Methanol

TBST

100 ml	TBS 10 x
1 ml	Tween 20
	<i>Aqua bidest.</i>

TBS 10 x

0,2 M	TRIS-HCl, pH 7,6
1,35 M	NaCl

MTBST

3 %	Milchpulver in TBST
-----	---------------------

2.9.3 ¹⁴C-Substrataufnahmeassay

Alle in diesem Kapitel aufgeführten Puffer wurden nach der Herstellung sterilfiltriert.

Messpuffer

pH	2,3	2,8	3,3	3,8	4,3	4,8	5,3	5,8	6,3	6,8	7,3	7,8
50 mM TRIS							x					
50 mM Citronensäure			x						-			
50 mM MES				-			x				-	
50 mM HEPES					-						x	

Material

Beispiel-Messpuffer pH 6,8:

50 mM TRIS
50 mM HEPES
pH 6,8

Substratpuffer

x mM Substrat (Na-Formiat, Na-Acetat, Na-Fluoracetat, Na-L-Laktat)
mit jeweiligem Messpuffer

Beispiel Substratpuffer 5 mM Formiat pH 6,8:

5 mM Na-Formiat
50 mM TRIS
50 mM HEPES
pH 6,8

Stocklösung 2,4-Dinitrophenol

100 mM 2,4-Dinitrophenol
in 70 % Ethanol

Stocklösung Carbonylcyanid-*m*-chlorophenylhydrazon

5 mM Carbonylcyanid-*m*-chlorophenylhydrazon
in 70 % Ethanol

Mcllvaine Puffer

Soll-pH des Puffers	[Citronensäure] in mM	[Natriumdihydrogenphosphat] in mM
2,8	84,4	31,2
3,8	64,5	71,0
4,8	50,7	98,6
5,8	39,5	121,0
6,8	22,8	154,4
7,8	4,3	191,4

Für jeden Puffer wurde Citronensäure und Natriumdihydrogenphosphat mit der jeweiligen Zusammensetzung eingewogen und mit a) *Aqua bidest.* oder b) Deuteriumoxid 99,9 % auf das bestimmte Volumen aufgefüllt. Der pH-Wert wurde anschließend überprüft. Es erfolgte keine Korrektur des pH-Wertes mit NaOH oder HCl. Für Puffer mit 5 mM Natriumformiat wurden Citronensäure, Natriumdihydrogenphosphat und Natriumformiat wie zuvor beschrieben behandelt.

Einfluss von Salzen

NaCl-Puffer

5 mM Na-Formiat
 50 mM TRIS
 50 mM HEPES
 100 mM NaCl
 pH 6,8

Na-Gluconat-Puffer

5 mM Na-Formiat
 50 mM TRIS
 50 mM HEPES
 100 mM Natriumgluconat
 pH 6,8

¹⁴C-Substratassay mit *E. coli*

Puffer pH 6,8

50 mM HEPES
 72 mM NaCl
 0,2 % Glucose
 pH 6,8

Puffer pH 3,8

50 mM Citronensäure
 72 mM NaCl
 0,2 % Glucose
 pH 3,8

Messpuffer pH 6,8

1 mM 5 mM Na-Formiat
 oder Na-Acetat
 50 mM HEPES
 72 mM NaCl
 0,2 % Glucose
 pH 6,8

Messpuffer pH 3,8

1 mM 5 mM Na-Formiat
 oder Na-Acetat
 50 mM Citronensäure
 72 mM NaCl
 0,2 % Glucose
 pH 3,8

2.9.4 pH-Messungen von Hefesuspensionen

Alle in diesem Kapitel aufgeführten Puffer wurden nach der Herstellung sterilfiltriert.

Inkubationslösung

4 mM MES
 0,5 % 2-Desoxy-D-Glucose
 pH 5,8

Stammlösung Natriumformiat

1 M Natriumformiat
 pH 5,8

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese wurde zur Auftrennung von DNA-Fragmenten eingesetzt. Dazu wurde 1 % Agarose in 50 ml TAE-Puffer suspendiert und in der Mikrowelle gelöst. 1 μ l Ethidiumbromid (10 mg ml⁻¹) wurde dem Gel vor dem Aushärten hinzugefügt. Anschließend wurde das Agarosegel in TAE-Puffer überführt, die Proben 1:10 mit Ladepuffer gemischt und in die Probenaschen pipettiert. Bei einer angelegten Spannung von 120 V wurden die DNA-Fragmente elektrophoretisch ihrer Größe entsprechend getrennt (20-60 min). Das hinzugefügte Ethidiumbromid ist ein DNA-Interkalator, dadurch konnte die getrennte DNA bei 366 nm detektiert werden. Die Größen der DNA-Fragmente konnten mithilfe des λ -Pst I-Größenmarkers (Abb. 3.1) abgeschätzt werden.

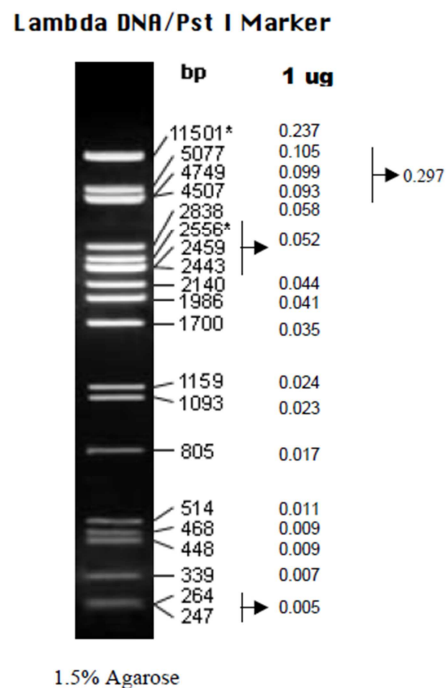


Abb. 3.1: DNA-Größenmarker für die Agarose-Gel-Elektrophorese

3.1.2 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Anschließend wurde das Hi Yield® Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit verwendet, um Salze, Ethidiumbromid und Agarose abzutrennen. Die gereinigte DNA wurde in 10 - 25 µl *Aqua bidest.* eluiert.

3.1.3 DNA-Plasmid-Isolierung aus Bakterien

Für die Plasmidisolierung wurde eine *E.coli*-Vorkultur in LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Aus 3 ml Vorkultur wurde mittels Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System die DNA isoliert und mit 50 µl *Aqua bidest.* eluiert.

3.1.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Menge wurde photometrisch bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ mit dem BioPhotometer (Innova 535) bestimmt und folgendermaßen berechnet:

$$c \text{ (} \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}\text{)} = A_{260 \text{ nm}} \times f \times \text{Verdünnung}$$

$f = 0,02$

bei Einzelstrang-DNA, RNA, Oligonukleotiden

$f = 0,04$

bei Doppelstrang-DNA

Die Reinheit wurde über das Verhältnis von $A_{260 \text{ nm}}$ zu $A_{280 \text{ nm}}$ beurteilt, da bei 280 nm Proteine erfasst werden. Lag das Verhältnis über 1,8 wurde die Probe für weitere Klonierungsarbeiten oder Transformationen verwendet.

3.1.5 Restriktionsverdau

1 µg DNA wurden in einem Volumen von 10-20 µl mit entsprechenden Restriktionsenzymen (1 U µg⁻¹ DNA) 1 h bis über Nacht inkubiert. Die Inkubationstemperatur sowie der Inkubationspuffer wurden anhand der Herstellerangaben gewählt. Soweit die Puffer kompatibel waren, wurde ein Verdau mit zwei Restriktionsenzymen durchgeführt.

3.1.6 Dephosphorylierung

Um die Religation eines Vektors zu vermeiden, wurde eine 5'-Dephosphorylierung durchgeführt. Dazu wurde 1 µg geschnittener Vektor mit 1 U *calf intestinal* alkalischer Phosphatase (CIAP) in Dephosphorylierungspuffer 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend das Enzym durch 15-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert.

3.1.7 Ligation

Ligationen von DNA-Fragmenten wurden mit einem *insert*-Vektor-Verhältnis von etwa 3:1 durchgeführt. Dazu wurde die DNA mit T4-DNA-Ligase und Puffer in einem 10 µl Ansatz entweder für 30 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C inkubiert.

3.1.8 Transformation von *E. coli*

Ligierte Plasmide wurden auf 100 µl chemisch kompetente Zellen (3.1.16) gegeben, welche vorher 5 min auf Eis aufgetaut wurden. Es erfolgte eine Inkubation auf Eis für 30 min, bei 42 °C für 30 s und erneut für 5 min auf Eis. Es wurden 900 µl LB-Medium hinzugefügt und bei 37 °C für 45-60 min unter Schütteln inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend 1 min bei 13 000 g zentrifugiert und 900 µl des Überstandes verworfen. Das Zellpellet in den restlichen 100 µl wurde resuspendiert und auf einer LB-Platte mit Selektionsantibiotikum ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.9 Schnelltransformation von *E. coli*

Für die Schnelltransformation wurden 0,2-0,5 µl DNA einer Minipräparation (3.1.3) auf aufgetaute, chemisch kompetente *E. coli* Zellen gegeben (siehe 3.1.8, 3.1.16) und auf Eis für 15 min inkubiert. Anschließend wurden 40 µl Zellsuspension auf LB-Platten mit Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.10 Transformation von *S. cerevisiae*

Für die Transformation von *S. cerevisiae* Stämmen wurde die Lithiumacetat-Methode verwendet (Gietz et al, 1995). Dafür wurde eine Dauerkultur des benötigten *S. cerevisiae*-Stammes auf einer YPD-Platte ausgestrichen und bei 29 °C für 3-5 Tage inkubiert. Von dieser Platte wurde eine Kolonie entnommen, in 5 ml YPD-Flüssigmedium überführt und bei 29 °C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) bestimmt und die Zellen in 50 ml YPD Flüssigmedium auf eine OD_{600} von 0,2 verdünnt. Diese Kultur wurde erneut bei 29 °C für 3-5 h unter Schütteln inkubiert bis eine OD_{600} von etwa 0,6 erreicht war. Die Zellen wurden bei 2 000 g für 5 min pelletiert, mit 25 ml *Aqua bidest.* gewaschen und anschließend in 1 ml *Aqua bidest.* resuspendiert. Pro Transformation wurden 100 µl der Zellsuspension vorgelegt, 240 µl PEG 3500 50 %, 36 µl Lithiumacetat 1 M, 50 µl *single stranded Carrier*-DNA (denaturierte DNA aus Lachssperma, 5 min bei 95 °C gekocht und anschließend auf Eis gekühlt), 33 µl *Aqua bidest.* und 1 µl Plasmid DNA hinzugefügt. Das Pellet wurde resuspendiert und für 45-60 min bei 42 °C inkubiert.

Nach erneuter Pelletierung für 30 s bei 13 000 *g* wurde in 1 ml *Aqua bidest.* resuspendiert, mit diesem eine weitere 1:10 Verdünnung durchgeführt und 100 µl Zellsuspension auf eine Agar-Platte mit SD-Selektionsmedium ausgestrichen. Dabei erfolgte die Selektion auf Orotidin-5'-phosphatdecarboxylase-Gen (*URA3*) enthaltene Plasmide. Die Platten wurden mit Parafilm abgedichtet und für 3-6 Tage bei 29 °C inkubiert.

3.1.11 Dauerkulturen von *E. coli*

Für Dauerkulturen von *E. coli* wurden 500 µl einer Übernachtskultur mit 500 µl Glycerol 80 % gut gemischt und bei -80 °C gelagert.

3.1.12 Dauerkulturen von *S. cerevisiae*

Für Dauerkulturen von *S. cerevisiae* wurden 500 µl einer Übernachtskultur mit 500 µl Glycerol 80 % (steril) gut gemischt und bei -80 °C gelagert.

3.1.13 Polymerasekettenreaktion

Um Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen für weitere Klonierungen einzuführen, wurden spezifische PCR-*primer* verwendet.

Die zu amplifizierende *template* Plasmid-DNA (20-40 ng) wurde mit 20 pmol Oligonukleotiden, 10 pmol dNTP-Mix, 10 µl 5x PCR-Puffer und 1 U *Taq*-Polymerase versetzt und auf 50 µl mit *Aqua bidest.* aufgefüllt.

Mittels Thermocycler wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

Tab. 3.1: PCR-Temperaturprogramm

94 °C	1 min	Denaturierung
28 Zyklen:		
94 °C	15 s	Denaturierung
T _m	20 s	<i>primer</i> -Anlagerung
68 °C	70 s	Extension
68 °C	5 min	Extension
8 °C	∞	Lagerung

Die Schmelztemperatur T_m wurde mit folgender Formel berechnet:

$$T_m = 64,9 + 41 \times GC (\%) - 600 N^{-1}$$

GC (%): GC-Gehalt des *primer*

N: Anzahl Basenpaare

Es wurde darauf geachtet, dass die Schmelztemperatur zwischen 50 und 60 °C liegt und dafür die *primer*-Länge gegebenenfalls angepasst.

3.1.14 *In vitro* Mutagenese

Die Einführung von Punktmutationen in die DNA-Sequenz erfolgte nach dem *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis* Protokoll von Stratagene. Als *template* wurde Plasmid-Doppelstrang-DNA eingesetzt. Die *Mutagenese-primer* in 5'-Richtung enthielten den Basenaustausch für die gewünschte Mutation in der Mitte. Der 3'-*primer* setzte direkt hinter der Mutationsstelle an. Die Länge der *primer* betrug meistens 30 bp, jedoch wurde darauf geachtet, dass der AT-Gehalt nicht über 60 % betrug und die Schmelztemperaturen beider *primer* ähnlich waren, sodass gegebenenfalls die *primer*-Länge leicht verändert wurde. Mutationen wurden mittels PCR unter Verwendung der *Pfu-Turbo®* DNA-Polymerase eingebracht (Tab. 3.2, Tab. 3.3). Das PCR-Produkt wurde anschließend mit 1 U *DpnI* für mindestens 5 h bei 37 °C inkubiert. *DpnI* ist ein Restriktionsenzym, welches methylierte DNA schneidet, dadurch konnte das *template* aus dem PCR-Ansatz entfernt werden. 10 µl dieses Ansatzes wurden für die Transformation von *E. coli* verwendet (3.1.8). Nach anschließender Plasmidisolierung wurde der Erfolg der Mutation mittels Sequenzierung überprüft (3.1.15).

Tab. 3.2: Pipettierschema für die *in vitro* Mutagenese-PCR

0,5 µl	<i>template</i>
1,5 µl	<i>primer sense</i> (25 µM)
1,5 µl	<i>primer antisense</i> (25 µM)
4 µl	dNTPs (2,5 mM)
5 µl	<i>Pfu</i> -Puffer 10 x
0,8 µl	<i>PfuTurbo</i> DNA Polymerase (250 U µl ⁻¹)
36,7 µl	<i>Aqua bidest.</i>

Tab. 3.3: Temperaturprogramm für *in vitro* Mutagenese-PCR

95 °C	30 s	Denaturierung
16 Zyklen:		
95 °C	30 s	Denaturierung
55 °C	1 min	<i>primer</i> -Anlagerung
68 °C	2 min pro kb, mindestens 8 min	Extension
68 °C	20 min	Extension
8 °C	∞	Lagerung

3.1.15 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde mit der Didesoxy-Kettenabbruchreaktion nach Sanger durchgeführt (Sanger et al, 1977). Dabei wurden fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide eingesetzt, welche zum Extensionsabbruch führen – die unterschiedlich langen DNA-Fragmente wurden über eine Kapillarelektrophorese getrennt und mittels verschiedener Farbfluoreszenz die entsprechende Base am 3' Ende identifiziert. Es wurde das GenomeTM Lab DTCS Quick Start Kit verwendet. 50-150 fmol DNA wurden ad 9,5 µl mit *Aqua bidest.* gefüllt und für 5 min bei 86 °C inkubiert. Darauf folgend wurden 2 µl DTCS Quick Start Master Mix und 1,5 µl Sequenzier-*primer* (5 µM) hinzugefügt, der Ansatz durch vorsichtiges Pipettieren gemischt und das Temperaturprogramm gestartet (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Temperaturprogramm für Sequenzierungs-Reaktion

86 °C	5 min	Denaturierung
30 Zyklen:		
96 °C	20 s	Denaturierung
50 °C	20 s	<i>primer</i> -Anlagerung
60 °C	4 min	Extension
8 °C	∞	Lagerung

In einem Reagiergefäß wurden 2 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2, 100 mM Na₂-EDTA pH 8,0 und 1 µl 20 mg ml⁻¹ Glykogen vorgelegt (*stop solution*). Das PCR-Produkt wurde mit diesem gemixt, mit 60 µl vorgekühltem 100 % Ethanol versetzt und 15 min bei 4 °C und 13 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen, das Pellet vorsichtig in 200 µl vorgekühltem Ethanol 70 % resuspendiert und für 5 min bei 4 °C und 13 000 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt und die überstehende Lösung entfernt. Das gewaschene DNA-Pellet wurde im Anschluss in der Vakuumzentrifuge bei Raumtemperatur für 20-30 min getrocknet und mit 30 µl Ladepuffer resuspendiert. Die kapillarelektrophoretische Auftrennung erfolgte mit dem Beckman DNA Sequencer CEQ™ 8000 und den GenomeLab Separationskapillaren von Beckman Coulter.

3.1.16 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurde die CaCl₂-Methode angewendet. Der *E. coli*-Stamm wurde auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde eine einzelne Kolonie entnommen und in 5 ml LB-Flüssigmedium in 50 ml-Erlenmeyerkolben bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach 10 h wurde diese Vorkultur in einen 500-ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml LB-Flüssigmedium überführt und über Nacht bei 20 °C und 200 U min⁻¹ inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die optische Dichte überprüft – lag diese zwischen 0,4 und 0,6, wurden die Zellen für 10 min auf Eis gekühlt. Darauf folgend wurden die Zellen bei 4 °C und 2 000 g für 10 min pelletiert, der Überstand verworfen, die Zellen in 15 ml kalter CaCl₂-Lösung 0,1 M vorsichtig resuspendiert und erneut für 10 min auf Eis gekühlt. Diese Arbeitsschritte wurden jeweils mit 10 ml CaCl₂ und 5 ml CaCl₂ + Glycerol 20 % wiederholt. Die Zellsuspension wurde für mindestens 4 h auf Eis inkubiert, zu je 100 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.1.17 Generierung N-terminal verkürzter FocA-Konstrukte

Folgende verkürzte Versionen wurden hergestellt:

FocA ΔN₁₋₁₉, FocA ΔN₁₋₁₉ K26A, FocA ΔN₁₋₁₉ K29A und FocA ΔN₁₋₂₉. Die kodierende DNA-Sequenz wurde mittels PCR so verkürzt, dass N-terminal die ersten 19 bzw. 29 Basen sowie der HA-tag nicht amplifiziert wurden (3.1.13). Gegebenenfalls wurde dabei eine Punktmutation eingebaut. Die verkürzten DNA-Sequenzen wurden über die Schnittstellen *Xba* I und *Xho* I in den Vektor pDRTXa ligiert.

3.2 Proteinchemische Methoden

3.2.1 Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus *S. cerevisiae*

100 ml Hefekultur wurde bis zu einer OD_{600} von 0,8-1 wachsen gelassen und die Zellen bei 4 °C für 5 min bei 2000 g zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde mit 50 ml kaltem *Aqua bidest.*, anschließend mit 10 ml Puffer B gewaschen und für mindestens 1 h bei -80 °C eingefroren.

Die gewaschenen Hefezellen wurden mit 500 µl Puffer B und 500 µl säuregewaschenen Glaskügelchen versetzt und 10-15 mal für 30 s gevortext. Zwischen jedem Intervall wurden die Zellen für mindestens 1 min auf Eis gekühlt. Zu große Zelltrümmer wurden bei 1000 g für 5 min bei 4 °C entfernt; der Überstand wurde entnommen, das Pellet mit 500 µl Puffer B gewaschen und die Überstände vereinigt. Der Überstand wurde erneut für 5 min bei 1000 g zentrifugiert. Der daraus gewonnene Überstand wurde für 40 min bei 100 000 g zentrifugiert, um die mikrosomale Zellfraktion zu pelletieren. Diese wurde anschließend mit 100 µl Puffer M resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

3.2.2 Proteinquantifizierung

Zur Proteinquantifizierung wurde der Bio-Rad Protein Assay benutzt. Dazu wurden 792 µl *Aqua bidest.* mit 8 µl Proteinlösung und 200 µl Bradford-Reagenz gemischt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei 595 nm gemessen. Als Negativkontrolle diente 800 µl *Aqua bidest.* gemischt mit 200 µl Bradford, welches ebenso für 5 min inkubiert wurde. Lag die Absorption außerhalb des Lambert-Beerschen Bereiches ($A = 0,2-0,8$), wurde die Proteinprobe 1:10 verdünnt. Bei einer vorherigen Kalibrierung wurden verschiedene Konzentrationen von BSA eingesetzt.

3.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteinproben entsprechend ihrer Größe aufzutrennen, wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE eingesetzt. Dazu wurden 5 %ige Sammelgele und 12,5 %ige Trenngele nach folgendem Schema zwischen zwei Glasplatten gegossen:

Tab. 3.5: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele

Sammelgel 5 %		Trenngel 12,5 %	
<i>Aqua bidest.</i>	2,4 ml	<i>Aqua bidest.</i>	5,25 ml
Sammelgelpuffer	1 ml	Trenngelpuffer	3 ml
Acrylamid-Lösung 40 %	0,6 ml	Acrylamid-Lösung 40 %	3,75 ml
TEMED	6 µl	TEMED	10 µl
APS (10 %)	25 µl	APS (10 %)	80 µl

Die Proteinproben wurden mit SDS-Ladepuffer versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden bis zu 30 µl in die Geltaschen gefüllt und die Apparatur mit Kathodenpuffer gefüllt. Als Größenmarker diente der peqGold Prestained Protein Marker III. Bei 120-160 V wurden die Proben zunächst im Sammelgel konzentriert und anschließend bei 160-200 V im Trenngel aufgetrennt, bis die Bromphenolblaubande aus dem Gel ausgetreten war. Die Trenngele wurden weiterhin für einen Westernblot (3.2.4) genutzt oder gefärbt.

3.2.4 Western Blot

Die zuvor mittels SDS-PAGE (3.2.3) getrennten Proteinen wurden mittels *semi dry* Elektrotransfer auf PVDF Membranen übertragen. Dazu wurden Whatman® Chromatography Papiere in Transferpuffer inkubiert und die PVDF Membran in Methanol aktiviert. 3 Whatmanpapiere mit der Größe des Trenngels wurden auf die Anode gelegt, es folgte die PVDF-Membran, das Trenngel und erneut 3 Whatmanpapiere. Der Elektrotransfer erfolgte bei 17 V für 60 min.

Anschließend wurde die Membran für mindestens 1 h bei Raumtemperatur mit MTBST-Puffer inkubiert, um unspezifische Bindestellen des Antikörpers zu blockieren. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C in MTBST, daraufhin wurde 3 x 10 s und 3 x 15 min mit TBST-Puffer bei Raumtemperatur gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörpers in MTBST für 1-2 h bei Raumtemperatur und erneut die Waschschrte wie nach der Primärantikörperinkubation. Der Sekundärantikörper wurde mittels Chemilumineszenz-Reaktion des Amersham ECL Plus Reagenzienkits erfasst und die Signale am Lumi Imager® betrachtet und ausgewertet.

3.3 Funktionsstudien in *S. cerevisiae*

3.3.1 Aufnahmeassay mit ^{14}C -markierten Substraten

Um die direkte Aufnahme von Substraten über die FNT-Membranproteine messen zu können, wurde ein hefebasierter Aufnahme-Assay mit ^{14}C -radiomarkierten Substraten verwendet. ^{14}C -Kohlenstoff ist ein schwacher β^- -Strahler mit einer Halbwertszeit von 5730 ± 40 Jahren und einer niedrigen Energie von 0,157 MeV. Dies hat zum Vorteil, dass Proben verfallsbeständig sind und die Sicherheitsmaßnahmen für den Strahlenschutz einfach umzusetzen sind.

Eine Hefekultur wurde bis zu einer OD_{600} von 0,8-1 wachsen gelassen und bei 2000-4000 g bei 4°C für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend mit *Aqua bidest.* gewaschen. Die Zellen wurden mit Messpuffer des entsprechenden pH-Wertes auf eine OD_{600} von 50 ± 5 eingestellt, zu je 80 μl in 1,5 ml-Reagiergefäße aliquotiert und bei Raumtemperatur gelagert ($18\text{-}20^\circ\text{C}$). Diese 80 μl Zellsuspension enthielt durchschnittlich 8,8 mg Hefe. Die Substratpuffer wurden mit 0,02-0,1 μCi (Ausnahme in 3.3.1.3) ^{14}C -radiomarkiertem Substrat versetzt. Um die Substrataufnahme zu starten, wurde ein Zellaliquot mit 20 μl markiertem Substratpuffer versetzt ($\text{OD}_{600} = 40 \pm 4$, Substratverdünnung 1:5) und durch schnelles Auf- und Abpipettieren gemischt. Pro biologisches Replikat wurden drei Messungen durchgeführt. Die Aufnahme wurde nach einer definierten Zeit gestoppt, indem 1 ml eiskaltes Wasser mit der Zellsuspension gemischt wurde und die Suspension sofort auf einen 2,2 μm Whatman® Cellulosefilter gegeben wurde. Überschüssiger Puffer und nicht aufgenommenes Substrat wurden über eine Vakuumpumpe abgesaugt, die Hefezellen verblieben auf dem Filter und wurden mit 7 ml eiskaltem Wasser gewaschen. Die Filter wurden anschließend in ein Szintillationsgefäß mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Quicksafe A) überführt und über Nacht darin aufgelöst. Die Szintillationsflüssigkeit enthält 50-70 % p-Ethoxynonylphenol und 30-50 % Diisopropyl-naphthalin (Abb. 3.2). Diese fluoreszierenden Moleküle werden durch die Energie der β^- -Strahlung angeregt und emittieren die Energie in Form von Licht (Abb. 3.3). Über einen Photomultiplier und eine Prozessoreinheit kann die Anzahl der emittierten Lichtsignale über 2 min aufgenommen werden und wird als *counts per minute* (cpm) dargestellt. Über eine Probe, die ausschließlich 3 ml Szintillatormix und 20 μl markierten Substratpuffer enthält (maximale Aktivität), kann auf die aufgenommene Menge Substrat zurückgeschlossen werden:

$$\text{Stoffmenge}_{\text{radioaktiv markiertes Substrat}} = \text{eingesetzte Aktivität pro Probe} \times \text{spezifische Aktivität}^{-1}$$

$$\text{Stoffmenge}_{\text{gesamt}} = \text{Stoffmenge}_{\text{radioaktiv markiertes Substrat}} + \text{Stoffmenge}_{\text{nicht-markiertes Substrat}}$$

$$\text{Stoffmenge}_{\text{In Zellen aufgenommen}} = \text{cpm}_{\text{Probe}} \times \text{cpm}_{\text{max}}^{-1} \times \text{Stoffmenge}_{\text{gesamt}}$$

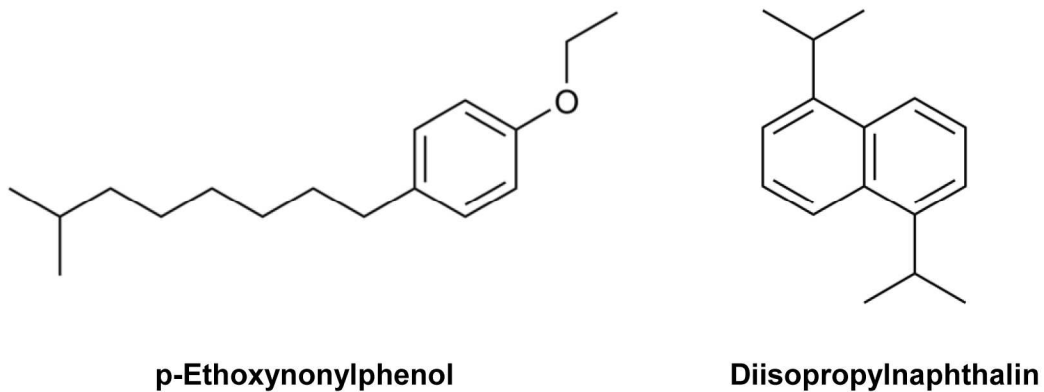


Abb. 3.2: Strukturformeln der im Szintillationsmix Quicksafe A (Zinsser Analytik) enthaltenen Moleküle p-Ethoxynonylphenol und Diisopropylnaphthalin

Die Firma deklariert eine Zusammensetzung von 50-70 % Diisopropylnaphthalin und 30-50 % p-Ethoxynonylphenol. Die Strukturformeln wurden mit ChemDraw[®] erstellt.

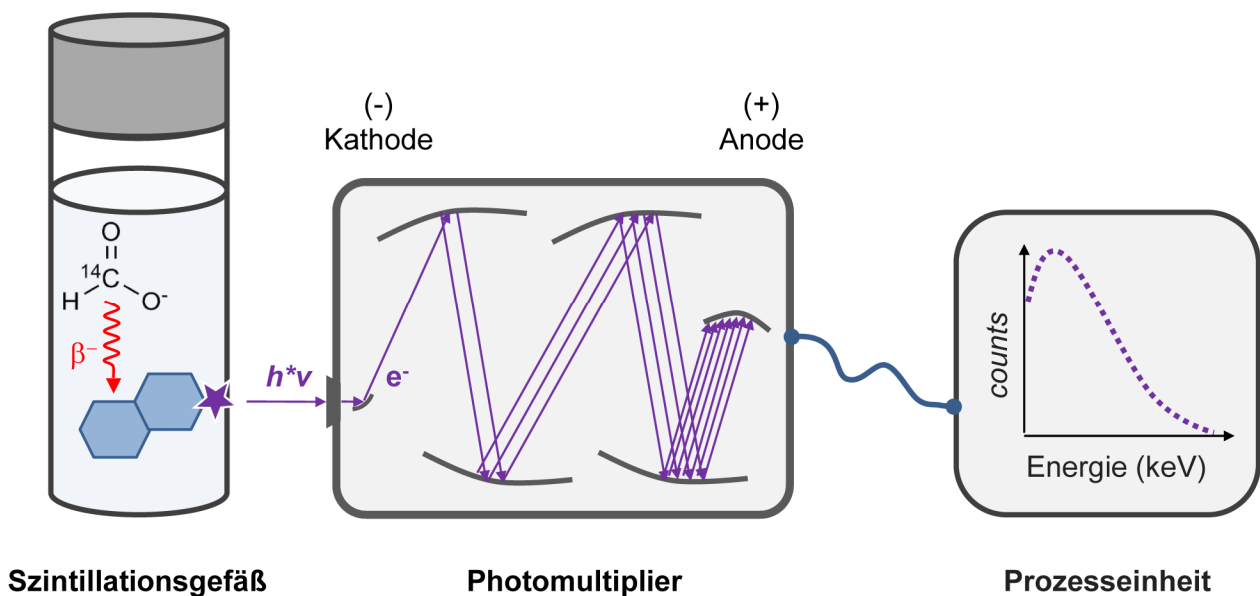


Abb. 3.3: Schema des Szintillationsprozesses

Die ausgesendete β^- -Strahlung regt Szintillatormoleküle an, welche Lichtsignale aussenden. Diese werden über einen Photomultiplier in Stromsignale umgewandelt und verstärkt. Die Stromimpulse werden als *counts per minute* aufgenommen.

3.3.1.1 Inkubation mit Protonophoren

Um den transmembranären Protonengradienten zu zerstören, wurden die Zellsuspensionen vor der Messung der Substrataufnahme mit den Protonophoren 2,4-Dinitrophenol (DNP) oder Carbonylcyanid-*m*-chloro-phenylhydrazon (CCCP) für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert (McLaughlin & Dilger, 1980). DNP wurde in einer Konzentration von 1 mM (100 mM Stammlösung in Ethanol 70 %) und CCCP mit einer Konzentration von 10 μ M (5 mM Stammlösung in Ethanol 70 %) eingesetzt. Aufgrund der pK_S -Werte wurde DNP ($pK_S = 4,0$) bei Messungen mit pH 2,8-4,8 eingesetzt, CCCP ($pK_S = 6,1$) bei Messungen mit pH 5,8-7,8. Der Assay erfolgte nach der Inkubation wie unter 3.3.1 beschrieben.

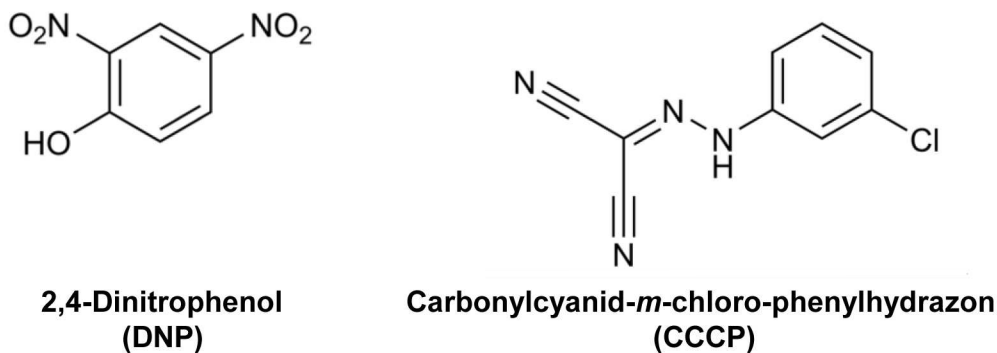


Abb. 3.4: Strukturformeln der eingesetzten Protonenentkoppler DNP und CCCP

Die Strukturformeln wurden mit ChemDraw[®] erstellt.

3.3.1.2 Messungen mit schwerem Wasser

Für Messungen mit schwerem Wasser wurde der McIlvaine-Puffer verwendet (McIlvaine, 1921). Mit diesem Puffer kann direkt über die Einwaage der Puffersubstanzen der pH-Wert festgelegt werden, ohne wässrige Natronlauge oder Salzsäure zum Einstellen des pH-Wertes verwenden zu müssen.

Hefekulturen wurden wie zuvor beschrieben kultiviert und pelletiert (3.3.1). Während des Waschschrittes wurde die Suspension in zwei gleich große Fraktionen aufgeteilt und pelletiert. Eine Fraktion wurde mit wässrigem McIlvaine-Puffer mit entsprechendem pH versetzt, um die optische Dichte einzustellen. Die zweite Fraktion wurde mit McIlvaine-Puffer mit schwerem Wasser (Deuteriumoxid) auf gleiche Weise behandelt. Auch die Substratpuffer wurden jeweils mit McIlvaine-Puffer hergestellt. Der Assay erfolgte darauffolgend wie in 3.3.1 beschrieben.

3.3.1.3 Bestimmung der Substrataffinität

Für die Bestimmung der Substrataffinität wurden die Zellproben mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen versetzt (Endkonzentrationen 1-150 mM). Das Verhältnis von radioaktiv markiertem Substrat zu nicht markiertem Substrat lag dabei zwischen 1:400 bis 1:1400 und wurde bei der späteren Berechnung der aufgenommenen Substratmenge berücksichtigt. Die Messwerte wurden über die Lineweaver-Burk-Darstellung linearisiert:

$$v^{-1} = K_m [S]^{-1} v_{\max}^{-1} + v_{\max}^{-1}$$

Die x-Achse wird von der Gerade bei K_m^{-1} geschnitten, die y-Achse bei v_{\max}^{-1} . So konnten K_m und v_{\max} bestimmt werden.

3.3.1.4 Bestimmung der Aktivierungsenergie

Die Proben wurden bei den Messungen wie in 3.3.1 beschrieben behandelt, jedoch vor dem Vermessen mindestens 20 min bei einer bestimmten Temperatur (4, 20, 25, 30 °C) inkubiert und während des Messvorgangs bei dieser Temperatur gehalten. Auch der Messpuffer wurde zuvor bei dieser Temperatur inkubiert.

3.3.2 pH-Messungen

200 ml Hefezellkulturen wurden in 1-l-Erlenmeyerkolben bis zu einer OD_{600} von 0,8-1 wachsen gelassen und anschließend bei 2000 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal mit *Aqua bidest.* gewaschen und anschließend mit Inkubationspuffer auf eine OD_{600} von 60 ± 3 eingestellt. Die Inkubation dauerte mindestens 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde 1 ml Hefesuspension in 7 ml *Aqua bidest.* verdünnt. Die Aufnahme wurde durch Zugabe von 20 mM Natriumformiat aus einer 1 M Stammlösung gestartet und der pH-Wert mit einem 5 s Intervall mithilfe der SenTix[®]950 pH-Elektrode verbunden mit dem Multi9310 pH-Meter aufgenommen.

Die im Inkubationspuffer enthaltene 2-Desoxyglucose wird in der Hefezelle phosphoryliert und ist als 2-Desoxyglucose-6-phosphat ein nicht-kompetitiver Inhibitor der Hexokinase und infolgedessen der Glykolyse (Wick et al, 1957; Sols & Crane, 1954; Chen & Gueron, 1992). Durch Zusatz dieser Substanz wird ein metabolischer Umsatz des Substrates und eine damit verbundene Protonengenerierung und Verfälschung der Ergebnisse verhindert.

3.4 Funktionsstudien in *E. coli*

Das zu exprimierende Zielgen FocA wurde in den pet21X-Vektor kloniert (Vorarbeiten Dr. Julia Holm-Bertelsen), anschließend wurden BL21 (DE3) pRep4-Zellen mit den Plasmiden transformiert. Die Selektion erfolgte auf LB-Platten mit Ampicillin und Kanamycin. Es wurde ein Klon über Nacht in 5 ml Flüssigselektionsmedium inkubiert (37 °C, 200 Umdrehungen min⁻¹). Diese Vorkultur wurde am nächsten Morgen in 200 ml frisches Selektionsmedium überführt und unter gleichen Bedingungen aerob bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 wachsen lassen. Die FocA-Expression erfolgte durch Zugabe von 100 µM IPTG für weitere 3 h. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert (4000 g, 4 °C, 10 min) und im Messpuffer resuspendiert (2.9.3). Die Messung erfolgte bis auf einige Abweichungen wie in 3.3.1 beschrieben:

Die Substratpuffer wurden pro Probe mit 0,1 µCi ¹⁴C-Formiat bzw. Acetat versetzt. Die Filtration erfolgte über 0,45 µm Nylonfilter (Whatman) und die Proben wurden mit 7 ml eiskaltem Substratpuffer gewaschen.

Für den Zellaufschluss wurden jeweils etwa 1 g Zellpellet in 6 ml Zellysepuffer (2.9.2) resuspendiert und die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen (5 x 30 s, 50 % Amplitude, nach 30 s jeweils 1 min auf Eis). Diese Proben wurden anschließend für den Proteinnachweis mittels Western Blot eingesetzt (3.2.4).

3.5 Bioinformatische Methoden

3.5.1 Bestimmung der Schnittfläche des Proteintransportpfades

Die 3D-Struktur des jeweiligen Proteins wurde in Chimera[®] geladen und ein Protomer ausgewählt. Es wurde eine Ebene durch drei definierte Atome berechnet und dargestellt. Distanzen zwischen den einzelnen Atomen wurden in Angström (Å) gemessen. Anschließend wurde die Proteinoberfläche dargestellt und ein Ebenenschnitt an der zuvor definierten Ebene durchgeführt, sodass die Solvens zugängliche Fläche farblich dargestellt war. Mithilfe der Bildanalyse-Software ImageJ[®] konnte daraufhin die Schnittfläche in Å² ermittelt werden.

3.5.2 Poisson-Boltzmann-elektrostatische Berechnungen

Für die Poisson-Boltzmann-elektrostatischen Berechnungen wurde das *Advanced Poisson Boltzmann Electrostatics tool* innerhalb der Chimera Software verwendet (Baker et al, 2001; Pettersen et al, 2004).

3.5.3 Bestimmung des pK_S von Aminosäuren innerhalb eines Proteins

Zur Bestimmung der pK_S Werte von Aminosäuren innerhalb von Proteinstrukturen wurde der DEPTH-Server verwendet (Chakravarty & Varadarajan, 1999; Tan et al, 2011; Tan et al, 2013).

Die Proteinstruktur (*pdb file*) wird dabei in eine präequilibrierte Wasserbox SPC216 gesetzt. Alle Wassermoleküle, die innerhalb eines Radius von 2,6 Å mit Atomen des Proteins kollidieren, werden entfernt. Wassermoleküle, die weniger als 2 benachbarte Wassermoleküle innerhalb eines Radius von 4,2 Å aufweisen oder sich in Proteinhohlräumen befinden, werden ebenfalls entfernt. Um die Dynamik des Bulkwassers zu simulieren, werden wiederholt neue Solvatationen simuliert, dabei wird das Protein jeweils um eine Achse mit bestimmter Gradzahl gedreht. Pro Solvation wird der Abstand eines jeden Atoms zum Bulkwasser gemessen. Somit kann die dielektrische Umgebung jeder Aminosäure abgeschätzt werden und damit die Abweichung des pK_S gegenüber wässriger Umgebung.

3.5.4 Solvatationsmodelle von Proteinen

Für Solvatationszyklen von FocA mit gebundenem Formiat oder Ameisensäure wurde Chimera verwendet. Die Proteinstruktur wurde mehrfach rotiert und jeweils in einer SPC/Fw Wasserbox solvatisiert. Dazu wurden die *amber tools* innerhalb der Chimera-Software benutzt (Case et al, 2016; Pettersen et al, 2004). Die Modelle wurden in dieser Arbeit von Prof. Dr. Eric Beitz erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Substratselektivität von FNTs

Zur Untersuchung des Transportmechanismus und der Selektivität von FNTs wurden geeignete Vertreter dieser Membranproteinfamilie gewählt. Der bakterielle Formiattransporter FocA gilt als Prototyp der FNTs, da sowohl die physiologische Funktion bekannt ist als auch mehrere Kristallstrukturen vorliegen. Des Weiteren wurde der eukaryotische Laktattransporter aus *Plasmodium falciparum* gewählt. In unserem Arbeitskreis wurden bereits erste funktionelle Untersuchungen des Transporters durchgeführt (Wu et al, 2015), welche ein breites Substratspektrum zeigten. Als weitere FNT-Vertreter wurden der bakterielle Nitrittransporter NirC sowie der eukaryotische Laktat-Transporter von *Babesia bovis* gewählt.

Als Testsystem wurde *S. cerevisiae* gewählt, da der Aufnahmeassay von ¹⁴C-markierten Substraten (3.3.1) in *S. cerevisiae* zuvor in diesem Arbeitskreis etabliert wurde (Dissertation Dr. Janis Rambow, 2015). Hefezellen haben sich dabei für die Testbedingungen als geeignet erwiesen.

4.1.1 Herstellung von FNTs in *S. cerevisiae*

Um die verschiedenen Fragestellungen beantworten zu können, musste zunächst überprüft werden, ob die zu untersuchenden FNTs im gewählten Hefezellsystem im ausreichenden Maß hergestellt und in die Hefemembran eingebaut werden. Die DNA-Plasmide, welche für die Hefetransformation (3.1.10) verwendet wurden, lagen teilweise bereits im Arbeitskreis vor: Das kodierende Gen für PfFNT war zuvor für das Hefesystem kodon-optimiert worden (Dissertation Dr. Sinja Bock, 2014). Wenn im Folgenden auf DNA-Ebene von PfFNT gesprochen wird, ist damit immer das kodon-optimierte synthetische Gen gemeint. Die BbFNT-DNA lag synthetisch vor, wurde jedoch zuvor nicht kodon-optimiert. EcFocA und EcNirC wurden zuvor aus cDNA amplifiziert. Alle wurden über die Restriktionsschnittstellen SpeI und XhoI in pDR196 eingebracht, welcher zusätzlich N-terminal einen Hämagglutinin (HA)-tag sowie C-terminal einen 10x-Histidin (His)-tag enthält. Dieser Vektor wird im Folgenden als pDRTXa bezeichnet.

Um die hefeeigene Substrataufnahme möglichst gering zu halten, wurde der *S. cerevisiae*-Stamm W303-1A Δ jen1 Δ ady2 verwendet, welcher *knockouts* der endogenen Monocarboxylattransporter

jen1 (Casal et al, 1999; Andrade & Casal, 2001) und *ady2* (Paiva et al, 2004) besitzt. Um die erfolgreiche Herstellung der FNTs in Hefezellen zu zeigen, wurden die mikrosomalen Fraktionen isoliert (3.2.1) und die Expression mittels SDS-PAGE (3.2.3) und Western Blot-Analyse (3.2.4) überprüft (Abb. 4.1).

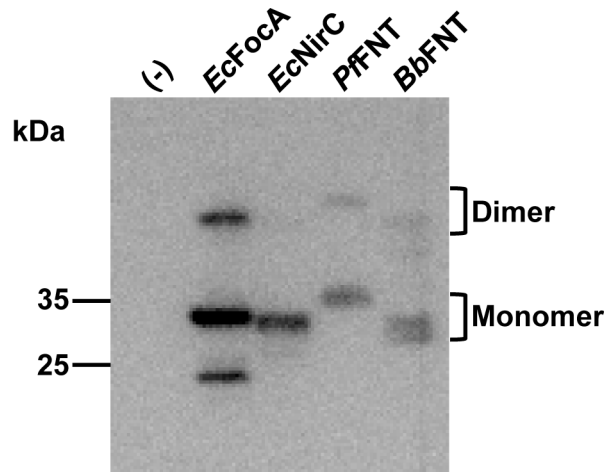


Abb. 4.1: Western Blot der mikrosomalen Fraktionen der Hefezellen mit FNTs

Die Proteine enthalten einen N-terminalen HA-tag und einen C-terminalen 10x-His-tag. Als Primärantikörper wurde ein monoklonaler α -HA-Antikörper eingesetzt.

Hefezellen mit Leerplasmid zeigten keine unspezifischen Signale. FocA hat mit HA- und 10x-His-tag ein berechnetes Molekulargewicht von 35 kDa. Es ist sowohl eine Monomerbande als auch eine SDS-resistente Dimerbande zu sehen. Zusätzlich ist ein Signal bei 23 kDa zu sehen – dabei handelt es sich nicht um ein unspezifisches Signal des Antikörpers, es wird sich dabei eher um ein Abbruchprotein handeln. Ein Westernblot, welcher mit einem α -Penta-His-Antikörper inkubiert wurde, der dieses Signal nicht zeigte, spricht ebenso dafür (Abb. 4.42). Berechnet man über das Molekulargewicht die Aminosäureanzahl des signalgebenden Konstruktes, könnte ein Abbruch zwischen der 5. und 6. Transmembranspanne der Grund sein. NirC zeigt ein Monomersignal mit einem Molekulargewicht von 32 kDa, das Signal der Dimerbande ist nur schwach zu erkennen. PfFNT (39 kDa) und BbFNT (34 kDa) ergeben sowohl Monomer- als auch Dimersignale.

Somit konnte gezeigt werden, dass alle zu untersuchenden FNTs erfolgreich in den Hefezellen hergestellt wurden und in der mikrosomalen Fraktion vorliegen. Dies weist zwar noch nicht den Einbau der Membranproteine in die Plasmamembran nach, jedoch kann dies indirekt über eine vorhandene Funktion nachgewiesen werden. Der erfolgreiche Einbau von PfFNT in die Hefemembran ist bereits mittels Biotinylierung von Dr. Julia Holm-Bertelsen in unserem Arbeitskreis nachgewiesen worden (Wu et al, 2015).

Die unterschiedlichen Signalstärken können keinen Aufschluss darüber geben, wieviel Protein sich in der Plasmamembran befindet. Für eine halbquantitative Aussage wäre ein Hefe-internes Vergleichsprotein nötig. Jedoch ist das Substratprofil, d. h. das Verhältnis der Aufnahme verschiedener Substrate, unabhängig von der Expression, sodass im Folgenden die Substratprofile untereinander verglichen werden können.

4.1.2 Ermittlung von Substratprofilen

Die folgenden funktionellen Daten wurden mittels radioaktiv markierter Substrat-Aufnahmeassays wie in 3.3.1 beschrieben generiert. Als Kontrolle wurden Hefezellen verwendet, welche das Leerplasmid pDRTXA enthalten. Die gemessene Substrataufnahme gibt dort also die reine Membrandiffusion an, welche unabhängig von den hergestellten Transportern ist. Es wurde ein einwärts gerichteter Gradient von 1 mM Formiat gewählt, der durch eine 1:5 Verdünnung einer 5 mM-Substratlösung mit einer Hefesuspension entstand. Zunächst wurde die Formiataufnahme bei pH 6,8 via FocA und PfFNT über die Zeit gemessen (Abb. 4.2). FocA zeigte eine wesentlich geringere Aufnahme, nach vier Minuten war die 2,4-fache Menge Formiat via PfFNT in die Zellen aufgenommen worden. Beide Aufnahmekurven zeigen nach vier Minuten eine beginnende Sättigung der Aufnahme (FocA: $0,089 \pm 0,005 \text{ nmol mg}^{-1}$, PfFNT: $0,209 \pm 0,024 \text{ nmol mg}^{-1}$).

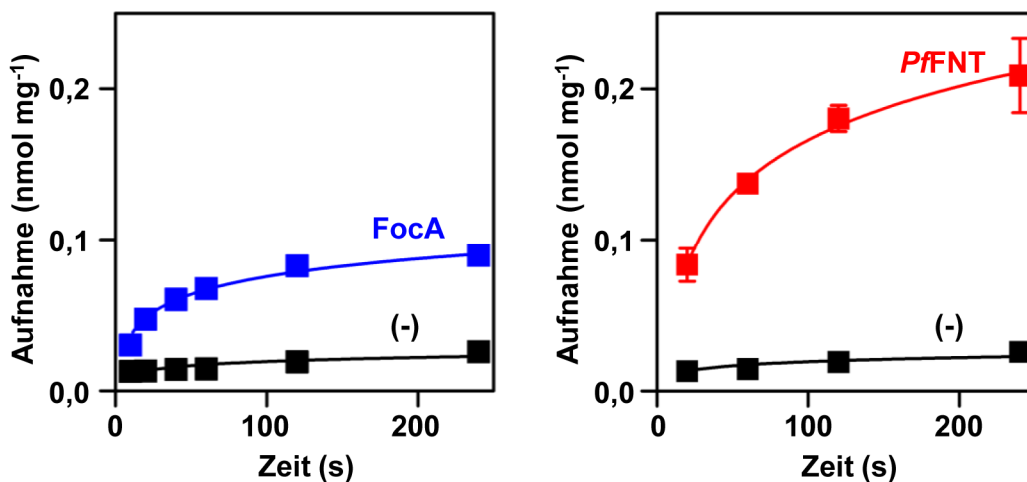


Abb. 4.2: Aufnahme von Formiat in Hefezellen via FocA (blau) und PfFNT (rot) bei pH 6,8

Die Daten wurden mit einem 1 mM Gradienten erhoben und auf 1 mg getrocknete Hefe normalisiert. Mit pDRTXA transformierte Hefezellen dienten als Negativkontrolle (-). Pro Datenpunkt wurde eine Dreifachbestimmung von jeweils drei biologischen Replikaten durchgeführt. Die Fehlerbalken geben S.E.M. an.

Um diese Beobachtung näher zu untersuchen, wurde das Spektrum der physiologischen Substrate auf Formiat, Acetat und L-Laktat erweitert sowie zwei weitere FNT-Vertreter untersucht. Dafür wurden das prokaryotische NirC sowie das eukaryotische *BbFNT* gewählt. André Gollmack übernahm die Untersuchungen des Nitrittransporters, Holger Erler führte die Aufnahmemessungen via *BbFNT* durch. Für jedes Substrat wurde ebenfalls die Membrandiffusion gemessen, und von den erhaltenen Transportwerten der untersuchten FNTs subtrahiert. Dies ist erforderlich, da jedes Substrat eine unterschiedlich starke Membrandiffusion aufweist, die ebenfalls von Gradient und pH-Wert abhängt. Durch den Abzug wird die rein durch die Transporter ermöglichte Aufnahme dargestellt und lässt einen Vergleich verschiedener Substrate zu (Abb. 4.3).

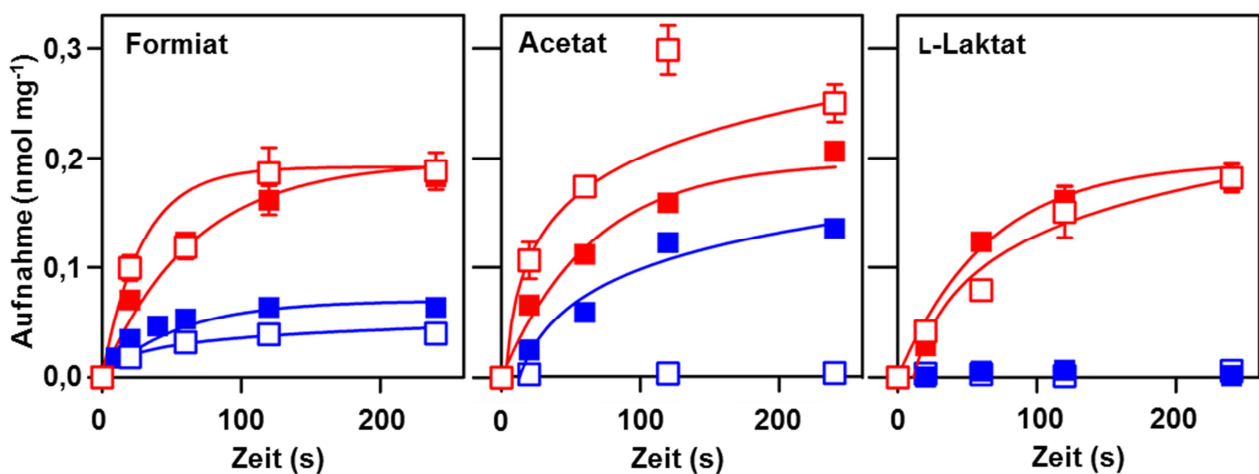


Abb. 4.3: Aufnahme von Substrat via FocA (blau, geschlossen) NirC (blau, offen), *PfFNT* (rot, geschlossen) und *BbFNT* (rot, offen), 1 mM Gradient, pH 6,8

Die Substrataufnahme via *BbFNT* wurde von Holger Erler gemessen, André Gollmack generierte die Daten für die Substrataufnahme via NirC. Mit pDRTXa transformierte Hefezellen dienen als Negativkontrolle. Es wurden jeweils drei Messungen von drei biologischen Replikaten generiert. Die Fehlerbalken stellen S.E.M. dar.

Bestimmt man die initiale Steigung einer zeitabhängigen Aufnahme, erhält man die Aufnahmeraten. Diese wurden durch Auswertung der Kurven aus Abb. 4.3 ermittelt.

Generell wiesen *PfFNT* und *BbFNT* größere Aufnahmeraten als FocA und NirC auf. Die beiden eukaryotischen Transporter zeigten jeweils etwa gleiche Aufnahmeraten von Formiat und Acetat, während L-Laktat in der Aufnahmerate etwa um die Hälfte reduziert war (Tab. 4.1).

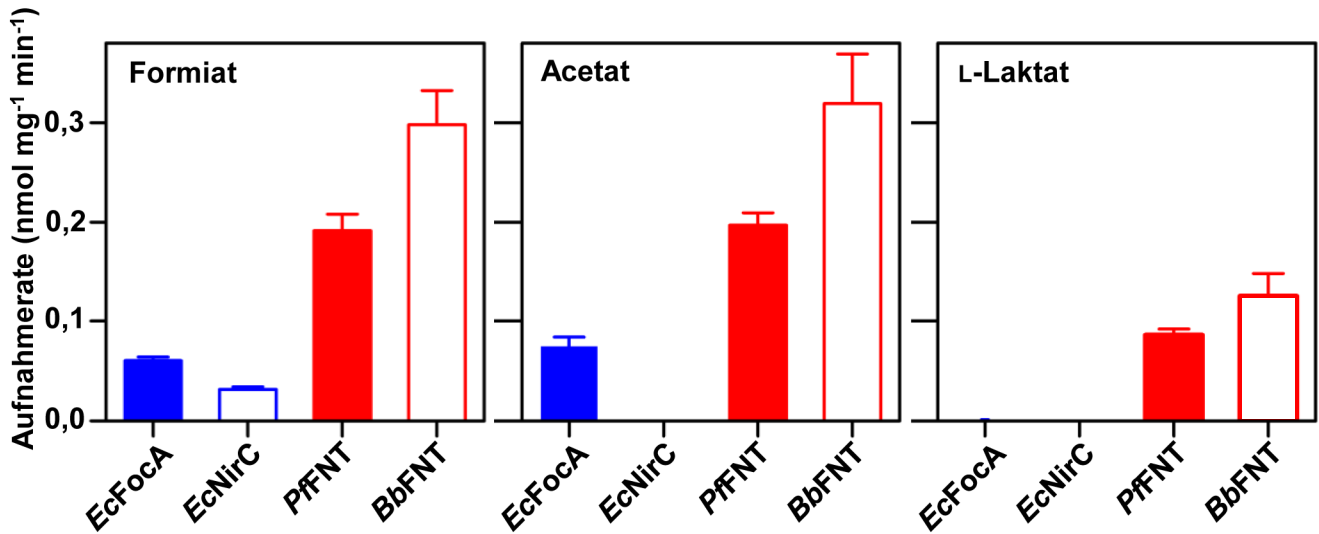


Abb. 4.4: Aufnahmearten von Substrat (1 mM Gradient, pH 6,8) via FocA (blau, geschlossen) NirC (blau, offen), PfFNT (rot, geschlossen) und BbFNT (rot, offen)
Die Raten wurden aus der initialen Steigung der Aufnahme aus Abb. 4.3 ermittelt. Die Fehlerbalken stellen S.E.M. dar.

Tab. 4.1 Transportprofile in Relation zu Formiat

Isoform	Transportraten in Relation zu Formiat (%)	
	Acetat	L-Laktat
FocA	115 ± 9	0
NirC	0	0
PfFNT	103 ± 6	45 ± 3
BbFNT	107 ± 16	42 ± 8

FocA zeigte zwar ähnliche initiale Transportraten von Formiat und Acetat, schloss jedoch L-Laktat aus. Dies steht im Kontrast zu vorherigen elektrophysiologischen Messungen, die eine Laktatfähigkeit (Lü et al, 2012a) erkennen ließen. NirC zeigte ein selektives Transportverhalten für das kleinste Substrat Formiat, welches bioisoster zum entsprechenden physiologischen Substrat Nitrit ist. Diese ersten Untersuchungen gaben Hinweise darauf, dass eukaryotische FNTs ein erweitertes Substratspektrum gegenüber prokaryotischen haben.

4.1.3 Identifizierung eines potentiellen Selektivitätsfilters

Um diese unterschiedliche Transportselektivität besser klassifizieren zu können, wurde der Transportpfad der FNTs basierend auf den vorhandenen Kristallstrukturen auf seine Aminosäurezusammensetzung überprüft. Abb. 4.5 zeigt das Seitenprofil des bakteriellen Formiattransporters FocA. Der lösungsmittelzugängliche Raum ist grau schattiert, die Konstriktionsstellen Aminosäuren sind in blau dargestellt. In allen FNT-Kristallen sind die Konstriktionen zu eng ($< 2,4 \text{ \AA}$), um Wasser bzw. ihre physiologischen Substrate durchzulassen, daher sind leichte Konformationsänderungen nötig, damit Substrate passieren können. Dies kann darauf hindeuten, dass die lipophilen Aminosäuren der Konstriktionsstellen für eine Substratselektivität verantwortlich sein könnten.

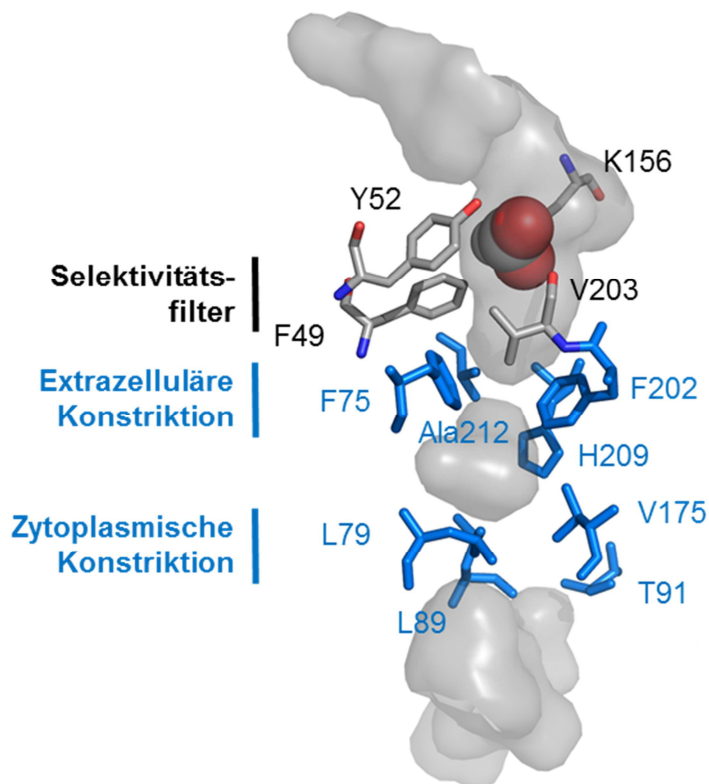


Abb. 4.5: Seitenansicht eines Monomers des Formiattransporters FocA (PDB # 3Q7K)

In blau sind die Konstriktionsbildenden Aminosäuren, in grau sind Aminosäuren im Poreneingang dargestellt. Ein mitkristallisiertes Formiatanion ist im Kalottenmodell zu sehen. Die graue Schattierung zeigt den lösungsmittelzugänglichen Raum an.

Ergebnisse

In der abgebildeten Kristallstruktur PDB # 3Q7K wurde FocA in Formiatpuffer kristallisiert. Im Kristall ist ein Formiatmolekül im Poreneingang des Transporters in direkter Nachbarschaft zu einem hochkonservierten Lysin (K156) lokalisiert. Die Poreneingang-bildenden Aminosäuren sind auf dieser Ebene F49, Y52 und V203 und liegen in der Nähe des Formiats. Auch dieser Bereich des Transportpfades kommt für die unterschiedliche Substratselektivität zwischen eukaryotischen und prokaryotischen FNTs in Frage.

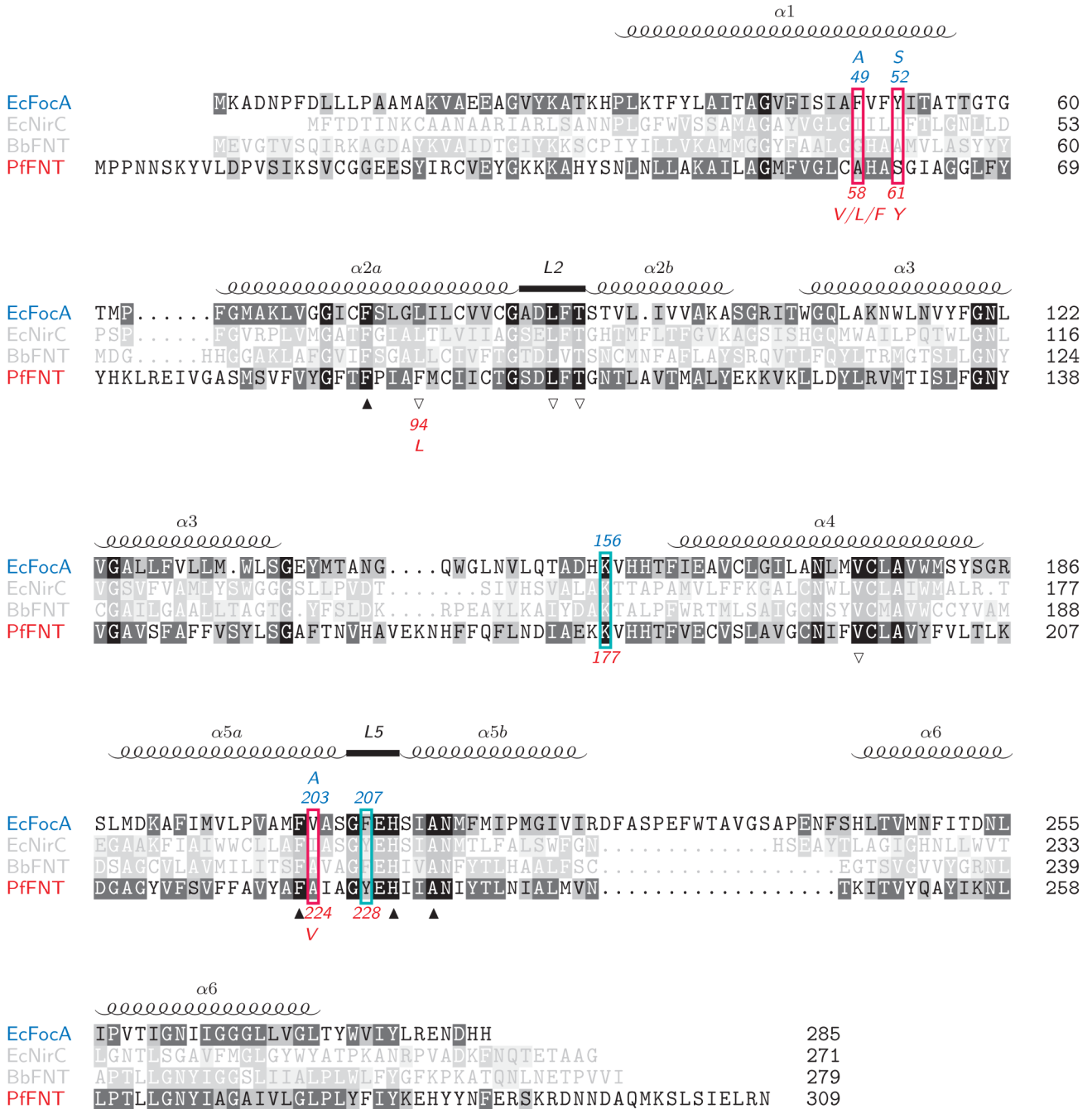


Abb. 4.6: Alignment der Proteinsequenzen von *EcFocA*, *EcNirC*, *PfFNT* und *BbFNT*
 Farblich hervorgehoben sind Aminosäuren im Poreneingang, die konstriktionsbildenden Aminosäuren sind mit Dreiecken markiert. Grafische Darstellung mit TEXshade® (Beitz, 2000).

4.1.4 Rolle der lipophilen Konstriktionen für die Substratselektivität

Die Untersuchung der Variabilität der acht Konstriktions-Aminosäuren zeigte, dass alle Positionen bis auf eine Ausnahme hoch konserviert sind (Abb. 4.6). *PfFNT* besitzt an Position 94 ein Phenylalanin anstelle eines Leucins. Es wurde untersucht, ob dieser konservative Aminosäureaustausch einen Effekt auf die Funktion des Transporters hat. Dazu wurde eine *PfFNT* F94L-Mutante generiert, welche erfolgreich in Hefen hergestellt wurde (Abb. 4.7). Die Transportrate wurde vom größten Substrat L-Laktat bestimmt und zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4.7, t-Test, $P < 0,05$). Auch die Position F90 in *PfFNT* ist innerhalb der FNTs nicht hoch konserviert. Der Austausch zu einem Cystein zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Laktataufnahme (Abb. 4.7, t-Test, $P < 0,05$). Dies lässt darauf schließen, dass die lipophilen Engstellen nicht für die Unterscheidung der verschiedenen großen Substrate zuständig sind. Allerdings muss es eine gewisse Bewegung innerhalb der Konstriktionen geben, damit die Substrate passieren können. Diese These wurde schon nach Erhalt der ersten Kristallstrukturen (Waight et al, 2010) aufgestellt und in späteren elektrophysiologischen Untersuchungen bestätigt (Lü et al, 2012a).

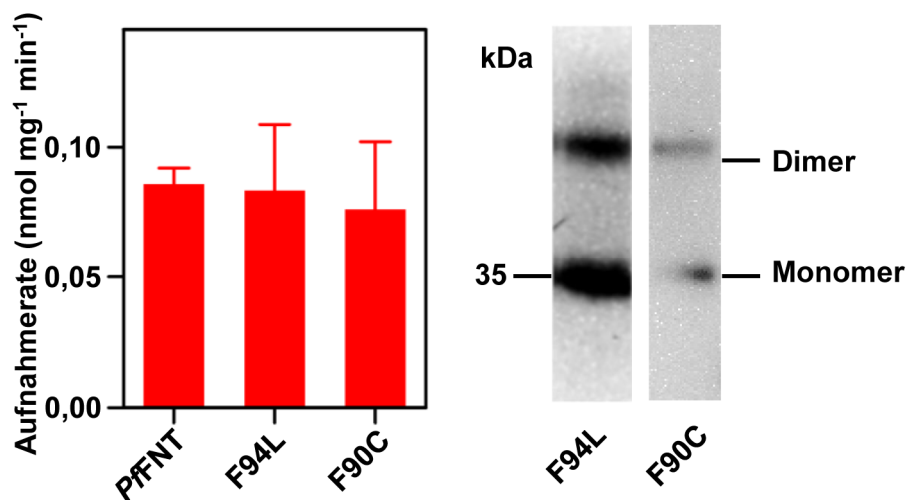


Abb. 4.7: L-Laktataufnahme via *PfFNT*-Wildtyp und Mutanten

Der Substratgradient betrug 1 mM L-Laktat bei pH 6,8. Von *PfFNT* Wildtyp wurden drei biologische Replikate hergestellt, von denen jeweils 3 Messungen durchgeführt wurden. Von *PfFNT* F94L und F90C wurden zwei biologische Replikate generiert. Die Fehlerbalken geben die S.E.M. an. Rechts ist der Proteinnachweis im Western Blot dargestellt. Es wurde der α -HA-Antikörper eingesetzt.

4.1.4.1 Sequenzanalyse prokaryotischer und eukaryotischer FNT-Vertreter

Um herauszufinden, ob die Konstriktionsstellen innerhalb aller prokaryotischen und eukaryotischen Subfamilien konserviert sind, wurden Proteinsequenzen von 71 FNTs verglichen (Marchetti et al,

2015). Dieses Alignment enthielt Proteinsequenzen von 41 eukaryotischen und 30 prokaryotischen FNTs. Aus diesen Daten wurde ein Subfamilien-Sequenzlogo von den acht Konstriktionsstellen sowie den relevanten Aminosäuren im Poreneingang erstellt (Abb. 4.8). Diese spezielle Form der Alignment-Darstellung zeigt relevante Aminosäure-Unterschiede zwischen zwei Protein-Subfamilien auf, in diesem Fall zwischen eukaryotischen und prokaryotischen FNTs. Dabei wird die Häufigkeit, also wie oft eine Aminosäure an einer bestimmten Position vorkommt, in das Verhältnis zur restlichen Aminosäurenkomposition an dieser Position gesetzt. Der Informationsgehalt wird in *binary digit* (bit) dargestellt. Zusätzlich wurde der prozentuale Anteil einer Aminosäure an einer bestimmten Alignment-Position mit dem entsprechenden Volumen der Aminosäure multipliziert. Somit kann das mittlere Volumen der Aminosäure an dieser Position dargestellt werden.

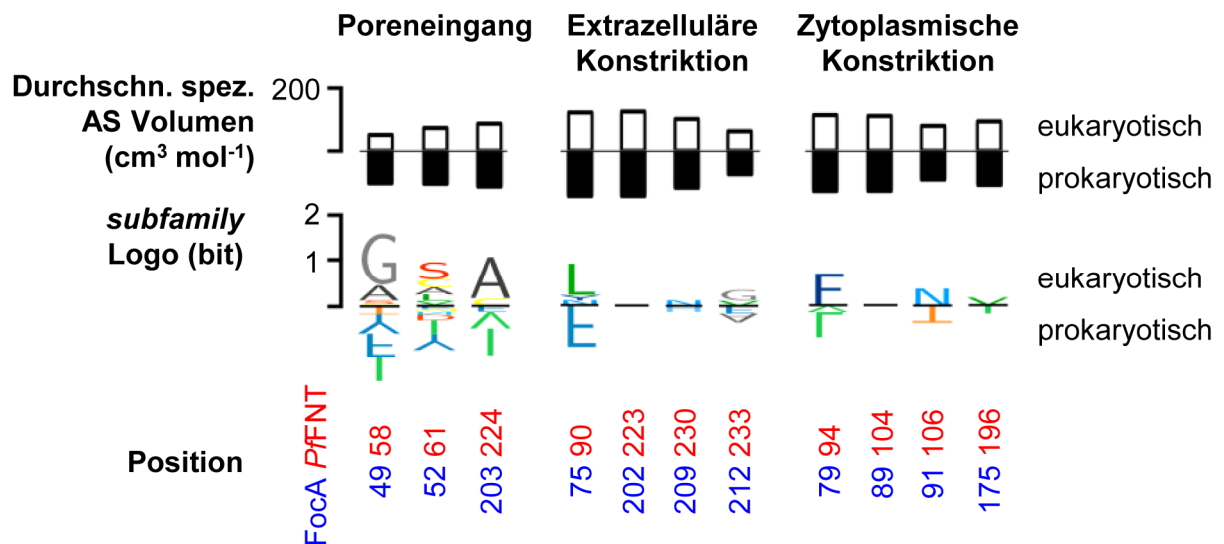


Abb. 4.8: Subfamilien-Sequenzlogo von prokaryotischen und eukaryotischen FNTs

Das Alignment der 71 FNT-Proteinsequenzen wurde von Holger Eler erstellt. Die untersuchten Positionen in FocA (blau) und PfFNT (rot) sind unten angegeben. Die oberen Balken geben die durchschnittliche Aminosäuregröße an dieser Position an. Das *subfamily*-Logo gibt die Häufigkeit einer Aminosäure an dieser Position an. Die Darstellung des Logos wurde mit TEXshade[®] (Beitz, 2000; Beitz, 2006) durchgeführt.

Diese strukturelle Auswertung zeigt, dass die lipophilen Engstellen innerhalb der FNTs stark konserviert sind. Bis auf zwei Positionen zeigen sowohl eukaryotische als auch prokaryotische FNTs wenig Varianz der Aminosäuren. Ein Austausch von Leucin und Phenylalanin zwischen der äußeren und inneren Konstriktion (Position 75/79 in FocA, Abb. 4.5) hat weder Einfluss auf die Lipophilie noch auf das mittlere Volumen der Aminosäuren an dieser Position. Somit können die lipophilen Engstellen als gröÙenselektive Substratfilter weitgehend ausgeschlossen werden.

Wesentlich aufschlussreicher ist die Analyse der drei Aminosäurepositionen innerhalb des Poreneingangs. Hier ist im *subfamily* Sequenzlogo zu sehen, dass an den Positionen 49 und 203 in FocA in eukaryotischen FNTs vor allem kleine Aminosäuren wie Glycin, Alanin oder Serin vorkommen, während prokaryotische FNTs an diesen Positionen große Aminosäuren wie Phenylalanin, Tyrosin oder Isoleucin enthalten. Dies führt dazu, dass die lösungsmittelzugängliche Fläche in dieser Ebene des FNT-Transportpfades zwischen eukaryotischen und prokaryotischen FNTs stark variiert.

4.1.4.2 Definition der Selektivitätsfilterfläche

Um die Ebene des potentiellen Selektivitätsfilters oberhalb des Poreneingangs besser definieren zu können, wurden Aufsichten der vier untersuchten Transporter auf den Poreneingang mittels Kristallstrukturen oder Modellen dargestellt (Abb. 4.9).

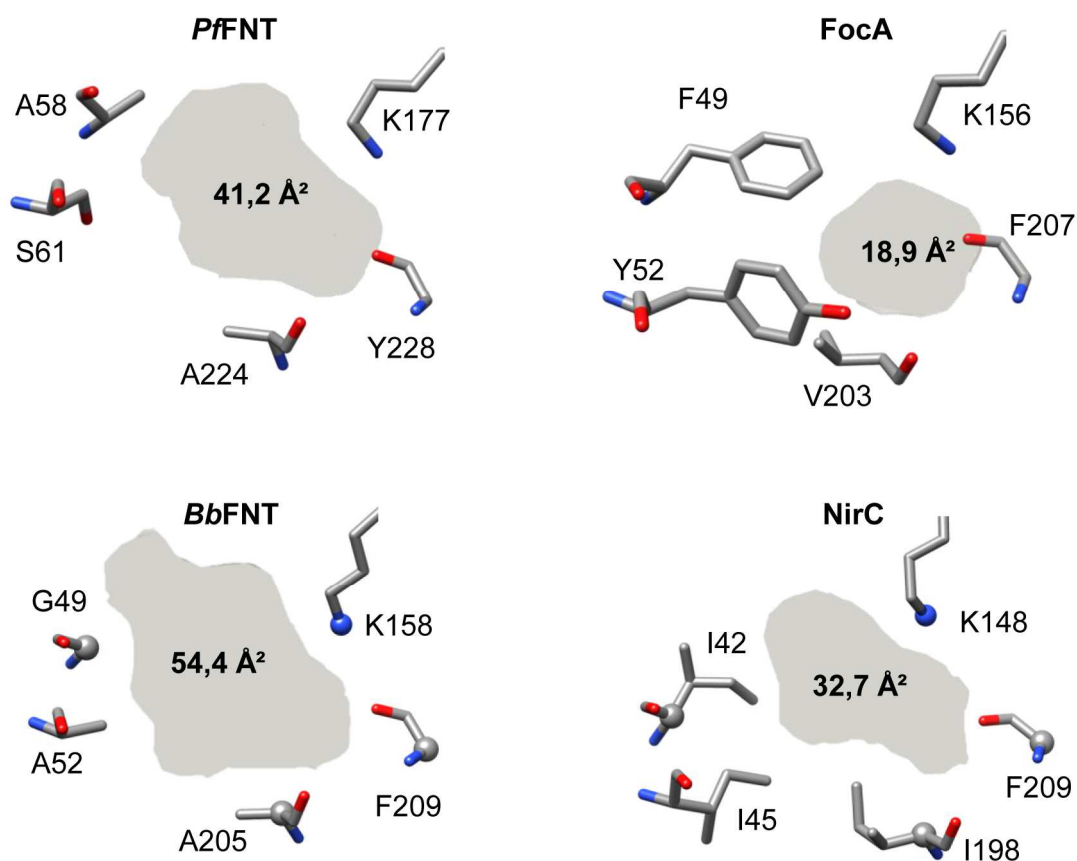


Abb. 4.9: Berechnete Filterflächen des putativen Selektivitätsfilters im Poreneingang

Für die Bestimmung wurden Strukturen von PfFNT (Modell basierend auf PDB # 3KCU), FocA (3Q7K), BbFNT (Modell basierend auf PDB # 3KCU) und NirC (4FC4) verwendet. Die Berechnung der Filterfläche erfolgte wie in 3.5.1 beschrieben.

Definiert wurde die Ebene des potentiellen Filters durch den ϵ -Stickstoff des konservierten Lysins (K156 in FocA, K177 in *PfFNT*) sowie durch die α -Kohlenstoffe der Aminosäuren an Position 49 und 203 in FocA bzw. 58 und 224 in *PfFNT*. Es wurde eine Strukturanalyse mittels Chimera[®] und ImageJ[®] durchgeführt (3.5.1) und so die Filterflächen der Ebene von *PfFNT*, FocA, *BbFNT* und NirC bestimmt. Während FocA und NirC als prokaryotische Vertreter Flächen von 19 und 33 Å² aufwiesen, zeigten *PfFNT* und *BbFNT* Flächen von 41 und 54 Å². Hier zeigte sich der Einfluss der unterschiedlichen Aminosäurekompositionen an dieser Ebene.

4.1.5 Mutationsanalyse des *PfFNT*-Selektivitätsfilters

Die These, dass eukaryotische FNTs durch einen größeren Selektivitätsfilter auch ein erweitertes Substratspektrum besitzen, war mittels funktioneller Daten zu verifizieren. Dazu wurden *PfFNT*-Mutanten hergestellt, die dem Selektivitätsfilter des prokaryotischen FocAs entsprechen. Es wurden daher zunächst folgende Mutationen durchgeführt: A58F, S61Y, A224V. Alle drei Mutanten konnten erfolgreich in Hefen hergestellt werden (Abb. 4.10). Von jeder Mutante wurden Strukturmodelle erstellt – dabei fiel auf, dass es durch das Ändern des Serins zu einem Tyrosin an Position 61 zu einer Kollision mit einem weiteren darüber liegenden Tyrosin an Position 86 kommt (Abb. 4.11). Dies führt zum Verlust der Funktionalität, was später auch durch Substrataufnahmeassays bestätigt werden konnte (Abb. 4.12, Tab. 4.2). FocA besitzt an der entsprechenden Position (*PfFNT*: Pos 86, FocA: Pos 71) ein Glycin, sodass es dort zu keiner Kollision kommen kann.

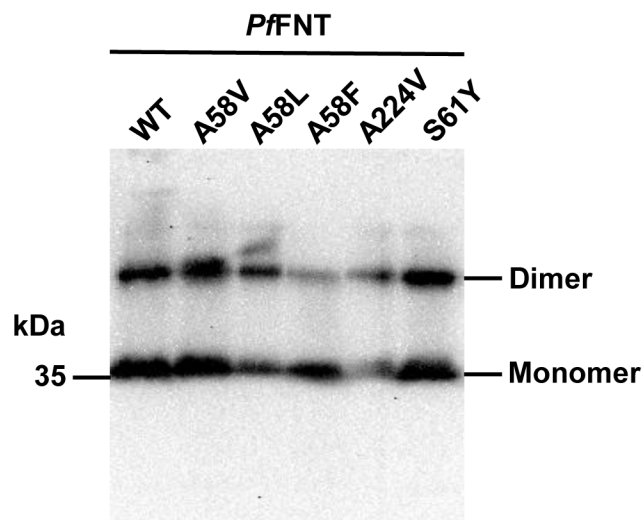


Abb. 4.10: Western Blot der mikrosomalen Fraktion von Hefezellen, welche *PfFNT*-Wildtyp (WT) sowie Mutanten hergestellt haben

Die Konstrukte enthalten einen N-terminalen HA-tag und einen C-terminalen 10x-His-tag. Als Primärantikörper wurde ein monoklonaler α -HA-Antikörper eingesetzt.

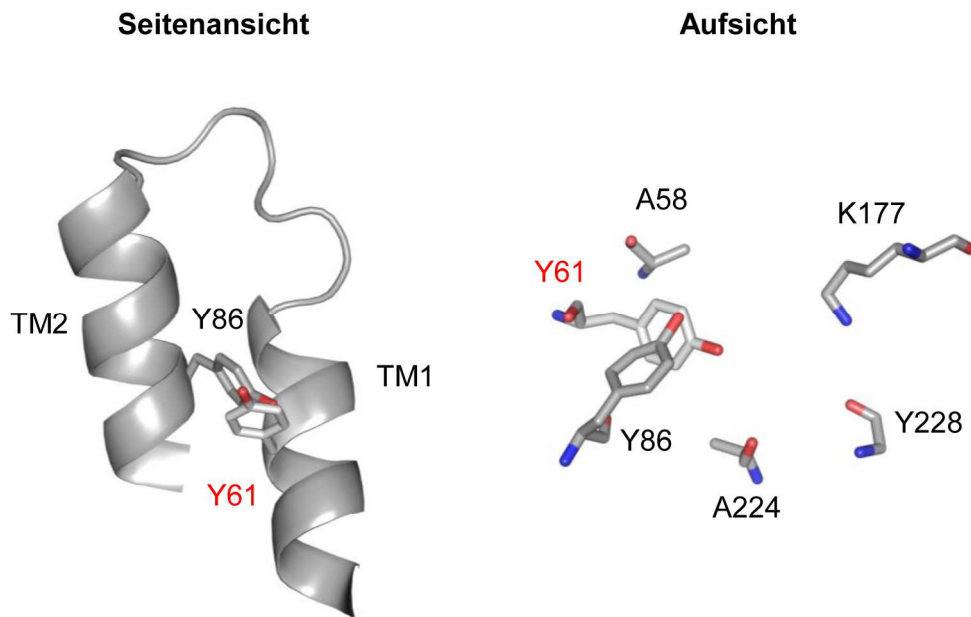


Abb. 4.11: Kollision von Y61 und Y86 im PfFNT S61Y Modell

Die TM1 und TM2a-Helices sind in der Seitenansicht als Schleife dargestellt, die Aufsicht zeigt die Aminosäuren des potentiellen Selektivitätsfilters. Darstellung mit Chimera[®] und Pymol[®].

Die Verengung des Porenfilters durch die A224V-Mutation verringerte die Fläche von 41 auf 37 Å². Dies führte zwar zu einer verringerten Aufnahme von allen drei Substraten, jedoch zu keinem Substratausschluss, das Substratprofil war mit dem des Wildtyps vergleichbar. Die Vergrößerung von A58 zu einem Phenylalanin führte zu einer verringerten Filterfläche von 25 Å², was einen Ausschluss von allen drei Substraten zur Folge hatte. Dies scheint zunächst erwartungswidrig, da FocA mit einer kleineren Filterfläche von 19 Å² noch immer Formiat und Acetat leitet. Durch die Einführung des Phenylalanins ist jedoch der Mindestdurchmesser der Filterfläche zwischen A224 und Position 58 stark verkleinert und liegt unterhalb des Mindestdurchmessers von FocA. Aus diesem Grund wurden an dieser Position weitere Aminosäuren eingeführt, die eine Größe zwischen Alanin und Phenylalanin haben: A58V und A58L. Auch diese beiden Mutanten wurden erfolgreich und vergleichbar zum Wildtyp in Hefen hergestellt (Abb. 4.10). Die Einführung eines Valins an Position 58 führte zu einer etwas kleineren Fläche (40 Å²) im Vergleich zum Wildtyp, funktionell hatte dies den Ausschluss von L-Laktat zur Folge. Die weitere Vergrößerung der Aminosäure zu einem Leucin (Filterfläche 29 Å²) führte zusätzlich zu einem fast vollständigen Acetatausschluss und somit zu einem praktisch selektiven Formiattransporter.

Durch diese schrittweise Vergrößerung der Aminosäuren an Position 58 konnte also die Substratselektivität über die Größe des Porenfilters titriert werden.

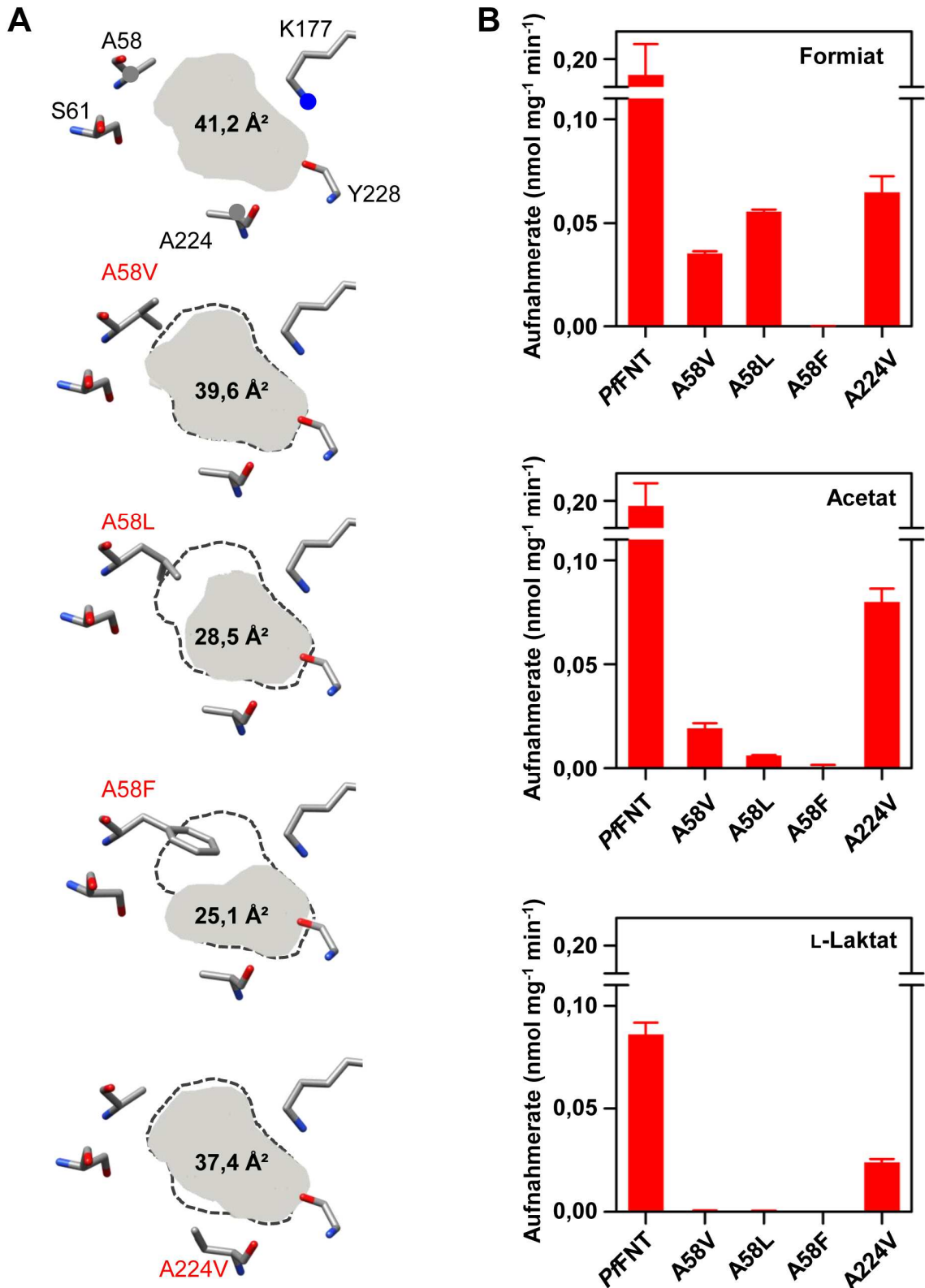


Abb. 4.12: Mutationsanalysen innerhalb des Selektivitätsfilters von *PfFNT*

(A) Einfluss von Mutationen auf Selektivitätsfilterfläche im Vergleich zum Wildtyp (gestrichelte Linie).
 (B) Substratprofile (Formiat-, Acetat-, L-Laktatleitfähigkeit) via *PfFNT* und Mutanten bei pH 6,8 (1 mM Gradient). Mit pDRTXa transformierte Hefezellen dienten als Negativkontrolle. Es wurden jeweils drei Messungen von drei biologischen Replikaten generiert. Die Fehlerbalken stellen S.E.M. dar.

Tab. 4.2: Transportprofile in Relation zu Formiat von *PfFNT* und Mutanten

Isoform	Transportraten in Relation zu Formiat (%)	
	Acetat	L-Laktat
<i>PfFNT</i>	103 ± 6	45 ± 3
A224V	123 ± 6	37 ± 3
A58V	54 ± 7	0
A58L	10 ± 1	0
A58F	kein Transport	
S61Y	kein Transport	

4.1.6 Mutationsanalyse des FocA-Selektivitätsfilters

Nachdem durch Verengen des eukaryotischen Substratfilters das Substratspektrum eingeschränkt werden konnte, wurde anschließend versucht, das Substratspektrum eines prokaryotischen FNTs durch schrittweise Vergrößerung des Substratfilters zu erweitern. Dazu wurden beim Formiattransporter FocA die voluminösen Aminosäuren an den Positionen F49, Y52 und V203 durch kleine Aminosäuren ersetzt, wie sie auch im eukaryotischen *PfFNT* vorliegen. Folgende Mutanten wurden dafür hergestellt: F49A, Y52S, V203A, F49A V203A, F49A Y52S V203A sowie V203G. Alle Mutanten konnten erfolgreich und in vergleichbarer Menge in Hefen hergestellt werden (Abb. 4.13).

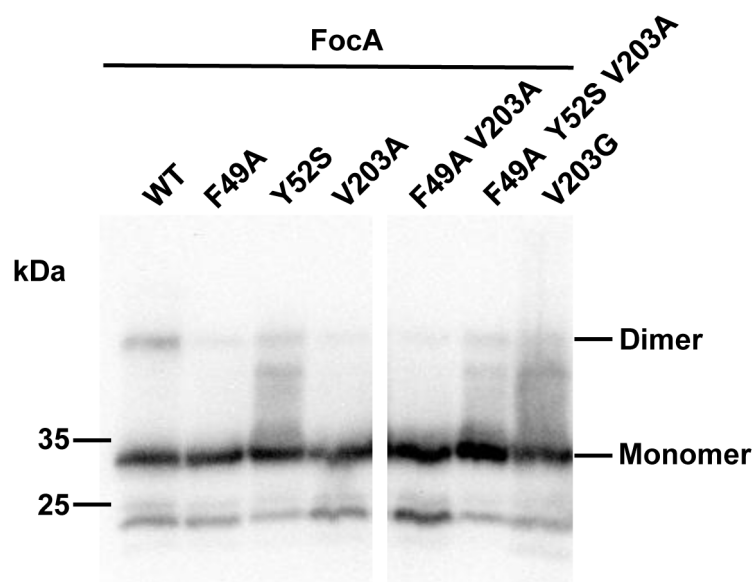


Abb. 4.13: Western Blot der mikrosomalen Fraktion von Hefezellen, welche FocA sowie Mutanten hergestellt haben

Als Primärantikörper wurde ein monoklonaler α -HA-Antikörper eingesetzt.

Es wurden auch hier Strukturmodelle erstellt, die Flächen des putativen Selektivitätsfilters berechnet und die funktionellen Substratprofile durch Messungen mit radioaktiv markierten Substraten bestimmt (Abb. 4.14, Tab. 4.3).

Zunächst wurde das Phenylalanin an Position 49 zu einem Alanin verkleinert. Dies führte zu einer Vergrößerung der Porenfläche von 19 auf 47 Å² und einer um das 1,5-fach erhöhten Acetataufnahme im Vergleich zu Formiat. Das Tyrosin an Position 52 hat nach struktureller und funktioneller Analyse einen geringen Einfluss auf die Substratselektivität. Die Fläche erhöhte sich kaum nach Einbringen eines Serins und auch das Substratprofil zeigte keine Veränderung – die Acetataufnahme ist im Verhältnis zu Formiat sogar verringert. Die Änderung von V203 zu einem Alanin hatte zwar keinen großen Einfluss auf die Porenfläche (von 19 auf 24 Å²), zeigte aber ebenso wie die F49A-Mutante eine 1,5-fach erhöhte Acetataufnahme. Das Kombinieren beider Aminosäureaustausche (F49A V203A) führte zu einer 2,5-fach erhöhten Acetataufnahme. Eine Mutante, die den Selektivitätsfilter von PfFNT nachstellt, F49A Y52S V203A, zeigte jedoch keine Veränderung gegenüber der Doppelmutante, sondern ein ähnliches Substratprofil wie der Wildtyp. Auch eine Verkleinerung des Valins an Position 203 zu einem Glycin zeigte keinen Unterschied zum Wildtyp. Bei keiner Mutante konnte eine L-Laktat-Leitfähigkeit gemessen werden. Dies spricht dafür, dass nicht nur die Flächengröße der definierten Selektivitätsfilterebene entscheidend für die Substratselektivität ist.

Tab. 4.3: Transportprofile in Relation zu Formiat von FocA und Mutanten

Isoform	Transportraten in Relation zu Formiat (%)	
	Acetat	L-Laktat
FocA	115 ± 9	0
F49A	152 ± 14	0
Y52S	64 ± 2	0
V203A	145 ± 3	0
F49A V203A	267 ± 24	0
F49A Y52S V203A	117 ± 7	0
V203G	119 ± 15	0

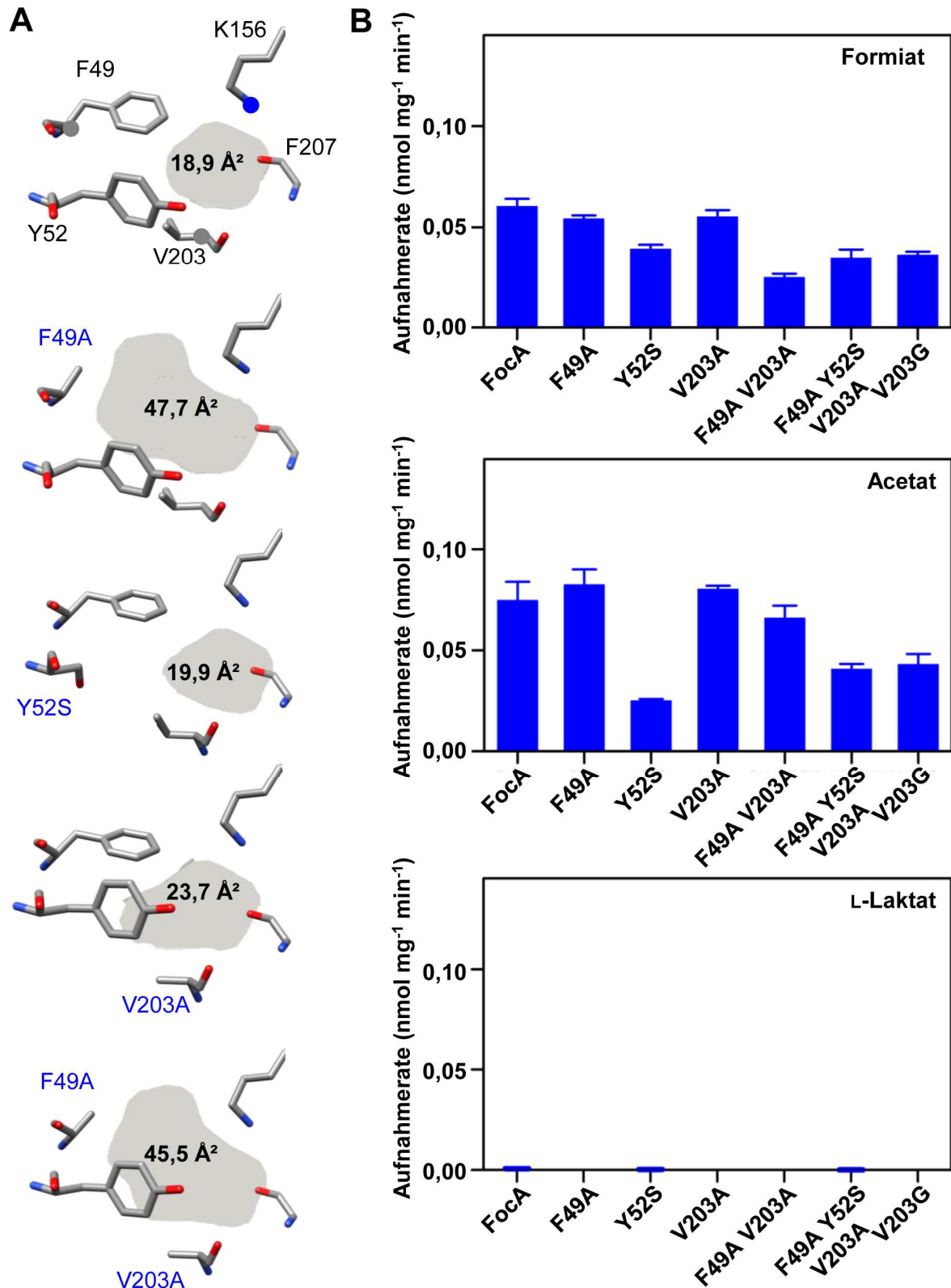


Abb. 4.14: Mutationsanalysen innerhalb des Selektivitätsfilters von FocA

(A) Einfluss von Mutationen auf die Selektivitätsfilterfläche. (B) Substratprofile (Formiat-, Acetat-, L-Laktatleitfähigkeit) via FocA und Mutanten bei pH 6,8 und einem 1 mM Gradienten. Mit pDRTXa transformierte Hefezellen dienen als Negativkontrolle. Es wurden jeweils drei Messungen von drei biologischen Replikaten generiert. Die Fehlerbalken stellen S.E.M. dar.

4.1.7 Auswertung

Die funktionellen und strukturellen Ergebnisse zeigen, dass das Volumen der Aminosäuren im Poreneingang einen Einfluss auf die Substratselektivität der FNTs hat. Der Selektivitätsfilter könnte aufgrund seiner Lage als hydrophobischer Lysin Filter (Φ/K) bezeichnet werden. Jedoch war es nicht möglich, eine L-Laktatleitfähigkeit bei prokaryotischen FNTs durch das Erweitern des Poreneingangs zu erzielen. In dieses Modell muss daher die dreidimensionale Betrachtung des Poreneingangs und der Substratmoleküle eingebracht werden. Dazu wurde zunächst die Frage untersucht, warum die Formiat- und Acetatleitfähigkeit trotz der verschiedenen Substratgrößen in allen vier Wildtyp-FNTs in einem ähnlichen Verhältnis vorlag. Formiat hat ein Substratvolumen von 36 \AA^3 , Acetat von etwa 54 \AA^3 . Geht man davon aus, dass das Substrat der FNTs mit der Carboxylgruppe voraus in den Poreneingang eintritt, sind die Molekülbreiten und -tiefen von Formiat und Acetat mit $5,3 \text{ \AA}$ gleich, einzig die Höhe des Moleküls variiert (Abb. 4.15). Dies könnte eine Erklärung für die gleichen Leitfähigkeiten sein. L-Laktat hingegen weist aufgrund seines Propangrundkörpers und der Hydroxylgruppe eine höhere Verzweigung auf und zeigt dadurch eine Breite von etwa 7 \AA . Dies bedeutet aber auch, dass nicht nur in der definierten Filterebene dieser erhöhte Durchmesser innerhalb der Pore vorhanden sein muss, sondern auch im gesamten Bereich oberhalb der Ebene, damit eine Leitfähigkeit ermöglicht ist. Aus dieser Überlegung heraus wurden in 3D-Strukturmodellen Seitenansichten der vier untersuchten FNTs betrachtet (Abb. 4.16). Dabei fiel auf, dass bei eukaryotischen FNTs der Poreneingang breit und trichterförmig geformt ist, während prokaryotische FNTs einen schmalen, rohrförmigen Poreneingang zeigen. Diese Beobachtung lässt zusammen mit den gesammelten funktionellen Daten die Aussage zu, dass eukaryotische FNTs (z.B. PfFNT) einen breiteren Poreneingang aufweisen, um die Leitfähigkeit ihrer physiologischen Substrate zu ermöglichen.

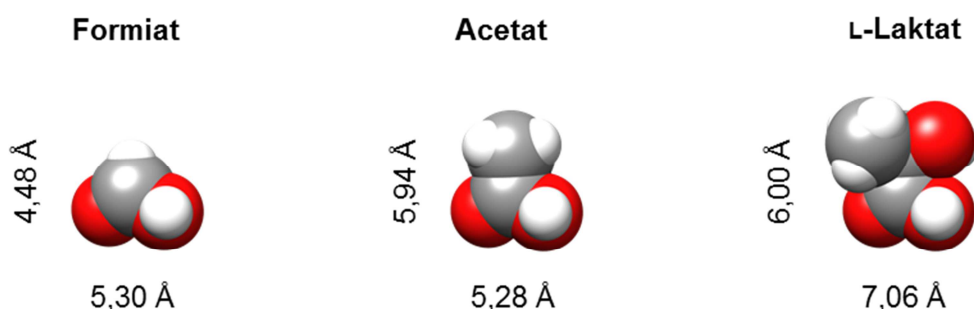


Abb. 4.15: Van-der-Waals Modelle der untersuchten Substratmodelle mit deren Projektionsdurchmesser

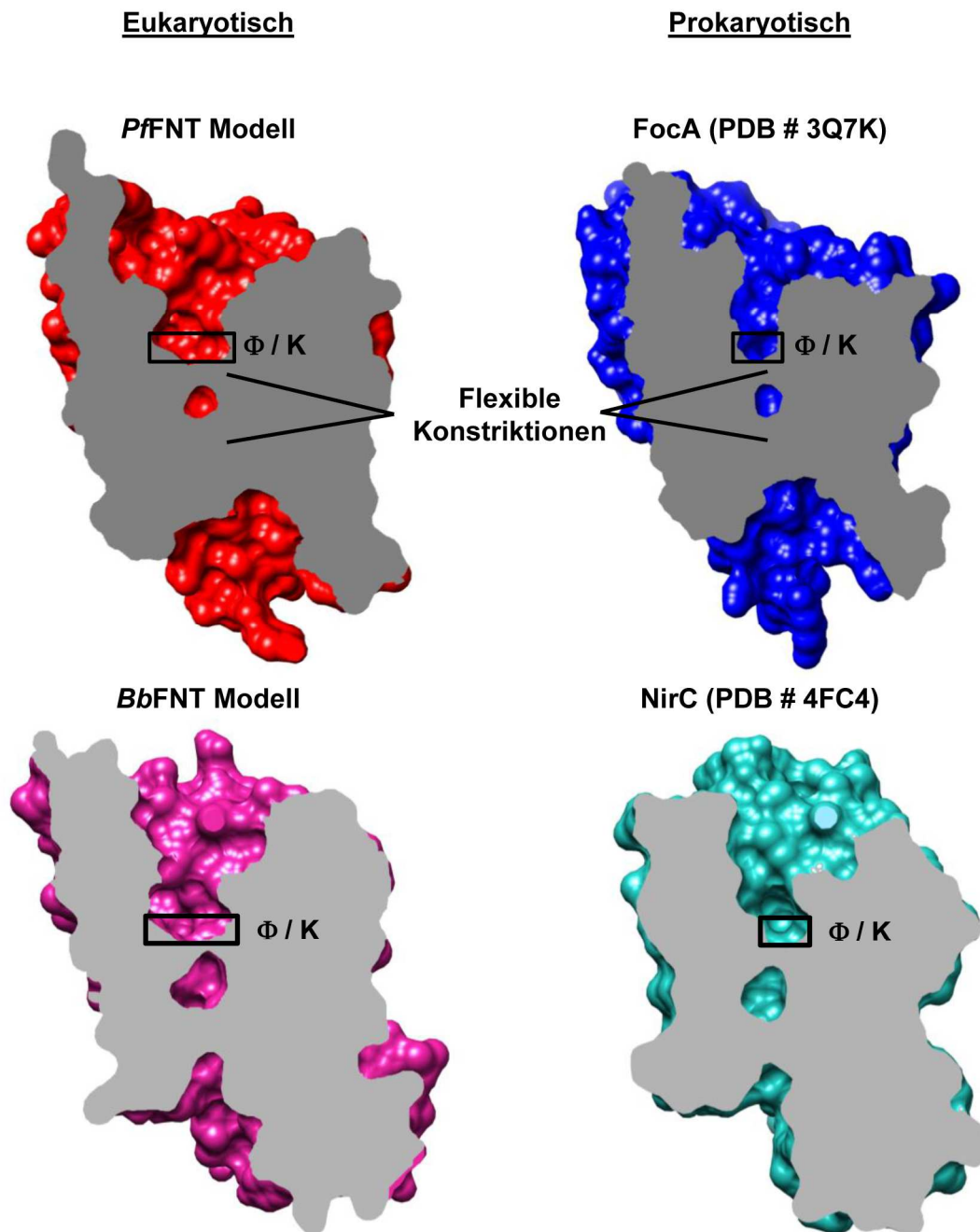


Abb. 4.16: Seitenquerschnitt und hydrophober Lysinfilter (Φ / K) der Monomere von FocA, *Pf*FNT, NirC, *Bb*FNT

Die Querschnittsflächen sind grau dargestellt. Die Strukturen von *Pf*FNT und *Bb*FNT wurden mit Swissmodel[®] basierend auf PDB # 3KCU erstellt.

4.2 Untersuchung des Resistenzmechanismus von *PfFNT*

Bei der Inkubation von *Plasmodium falciparum*-Kulturen mit der dreifachen IC_{50} -Konzentration des *PfFNT*-Inhibitors MMV007839 kam es zum Auftreten von Resistenzen (Golldack et al, 2017). DNA-Sequenzierungen der resistenten Parasiten zeigten einen Austausch von Glycin zu Serin (G107S). Die Bestimmung des IC_{50} Wertes von MMV007839 an *PfFNT* in *S. cerevisiae* wurde von André Golldack durchgeführt. Die Inhibitorcharakterisierung in Parasiten sowie die Kultivierung und Sequenzierung der Resistenzmutante ist im Arbeitskreis von Dr. Tobias Spielmann (Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg) durchgeführt worden. Der Effekt der Mutation G107S in *PfFNT* sorgt für eine 120-fach verminderte Hemmwirkung des Inhibitors MMV007839 in *S. cerevisiae* von 170 nM auf 21 μ M und eine 240-fach verminderte Hemmwirkung in Parasitenkulturen *Plasmodium falciparum* 3D7 von 140 nM auf 35 μ M (Golldack et al, 2017). Um zu untersuchen, welche Auswirkungen der Aminosäureaustausch auf die Funktion des Transporters hat, wurde die Mutation G107S sowie weitere Varianten im Hefevektor durchgeführt und die Herstellung des Transporters in Hefezellen durch Western Blot-Analyse überprüft (Abb. 4.17). Alle Mutanten wurden erfolgreich und in vergleichbarer Menge hergestellt.

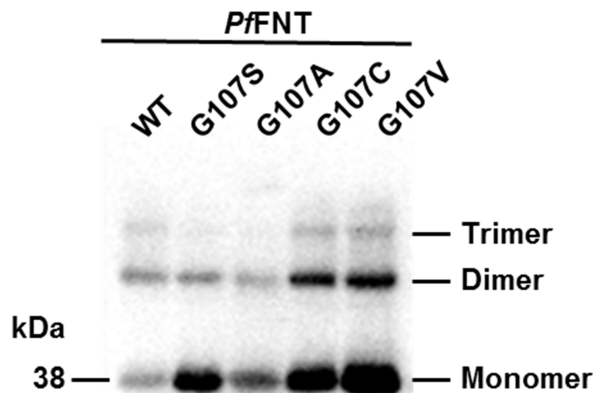


Abb. 4.17: Western Blot der mikrosomalen Fraktionen von Hefezellen mit Expression von *PfFNT* und G107-Mutanten

Als Primärantikörper wurde ein monoklonaler α -HA-Antikörper eingesetzt.

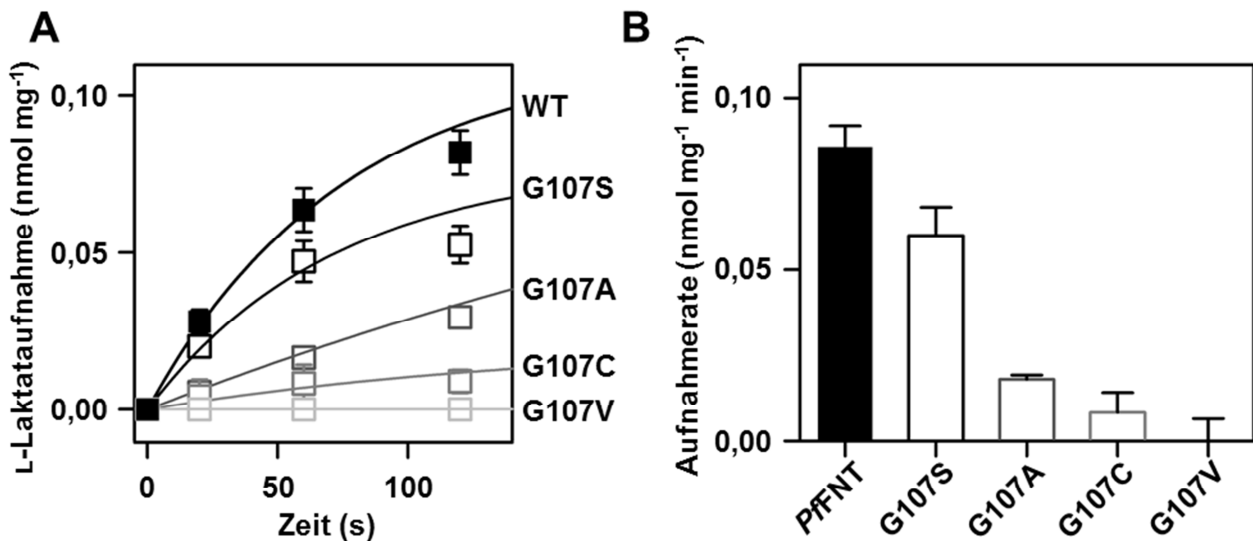


Abb. 4.18: Zeitabhängige L-Laktataufnahme (A) und daraus errechnete Aufnahmeraten (B) via PfFNT und G107-Mutanten in Hefezellen (Gradient: 1 mM, pH 6,8)

Mit pDRTXa transformierte Hefezellen dienten als Negativkontrolle. Es wurden jeweils drei Messungen von drei biologischen Replikaten generiert. Die Fehlerbalken stellen S.E.M. dar.

Die verschiedenen Konstrukte wurden bei einem pH-Wert von 6,8 durch die Untersuchung der zeitabhängigen L-Laktataufnahme überprüft (Abb. 4.18). Die G107S-Mutante zeigte gegenüber dem Wildtyp eine um 30 % herabgesetzte Aufnahmerate, der Unterschied ist signifikant (t-Test, $P < 0,05$). Überraschenderweise hatte ein Austausch des Glycins zu einem Alanin eine größere Auswirkung auf den Transport als G107S (25 % des Wildtyptransports). Das Vergrößern der Aminosäure zu einem Cystein hatte nur noch 20 % der Aufnahmerate des Wildtyps zur Folge, eine Vergrößerung zu Valin zeigte keinen Transport mehr.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Resistenz-gebende Mutation G107 den Inhibitor MMV007839 an der Bindung am Transporter hindert, jedoch immer noch eine Aufnahmefunktion des Transporters vorhanden ist, sodass die Parasiten überleben können (Golldack et al, 2017). Über eine schrittweise Vergrößerung der Aminosäure an Position 107 konnte die Transportfunktion titriert werden. Innerhalb der FNTs kommen an entsprechender Position ausschließlich Glycin und Serin vor.

4.3 Formiat-Protonen-Sympport von FocA

4.3.1 pH-abhängige Formiataufnahme via FocA

PfFNT zeigte in vorherigen Untersuchungen ein pH-abhängiges Aufnahmeverhalten (Wu et al, 2015): die Azidifizierung des äußeren Mediums führte zu einem erhöhten Import von L-Laktat in Hefezellen. *FocA* wurde bisher mit elektrophysiologischen Methoden untersucht, bei dem ein starker Abfall der Leitfähigkeit ab pH 5,6 festgestellt wurde (Lü et al, 2012a). In elektrophysiologischen Messungen wird jedoch nur die geladene Spezies des Substrates erfasst. Formiat mit einem pK_S -Wert von 3,8 zeigt im aziden Medium eine erhöhte Anzahl an protonierter, ungeladener Spezies, welche elektrophysiologisch nicht erfassbar ist. Es wurde die pH-Abhängigkeit von *FocA* mittels Aufnahmeassay mit radioaktiv markierten Substraten in Hefen (3.3) untersucht, da hier die gesamte Substrataufnahme unabhängig von ihrem Ladungsstatus erfasst werden kann.

Zunächst wurde die Formiataufnahme bei einem neutralen pH-Wert 6,8 über die Zeit gemessen. Wurde die Aufnahme im sauren Milieu bei pH 3,8 durchgeführt, hatte dies eine 20-fach erhöhte Aufnahmemenge in die Zellen sowie eine 37-fach erhöhte initiale Aufnahmerate zur Folge (Abb. 4.19). Somit konnte beim Formiattransporter *FocA* eine ähnliche Beobachtung der pH-abhängigen Substrataufnahme wie zuvor beim Laktattransporter *PfFNT* gemacht werden.

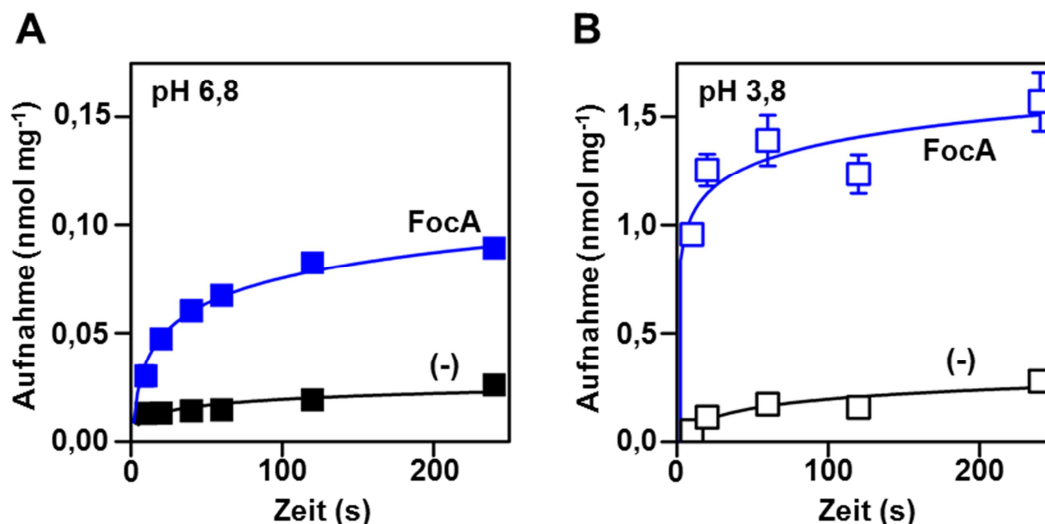


Abb. 4.19: Aufnahme von ^{14}C -Formiat in Hefezellen via *FocA* (blau) bei pH 6,8 (A) und 3,8 (B)
Die Daten wurden mit einem 1 mM Gradienten erhoben und auf 1 mg getrocknete Hefe normalisiert. Mit pDRTXa transformierte Hefezellen dienten als Negativkontrolle (-). Pro Datenpunkt wurde eine Dreifachbestimmung von jeweils drei biologischen Replikaten durchgeführt. Die Fehlerbalken geben S.E.M. an.

Um dies näher zu untersuchen, wurden initiale Aufnahmezeiten bei verschiedenen pH-Werten zwischen 2,8 und 7,8 bestimmt und somit ein pH-abhängiges Aufnahmeprofil von Formiat via FocA dargestellt (Abb. 4.20). Dieses zeigt steigende Aufnahmezeiten im sauren Medium und ein Ratenmaximum von $2,23 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, welches im Bereich des pK_S -Wertes liegt. Ist der pH-Wert unterhalb des pK_S -Wertes, sinkt auch die Aufnahmezeit. Im Folgenden wurden keine Versuche mit einem saureren pH-Wert des Mediums als 2,3 durchgeführt, da die Stabilität der Hefen bei diesen Bedingungen nicht mehr gewährleistet war. Diese glockenförmige Kurve der Substrataufnahme gleicht der beobachteten pH-abhängigen L-Laktataufnahme via *PfFNT* (Wu et al, 2015).

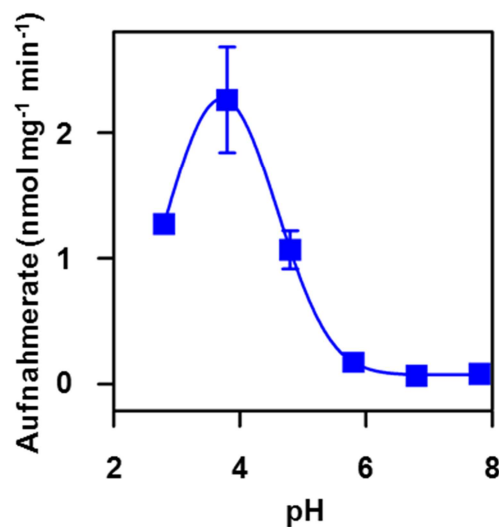


Abb. 4.20: pH-abhängige ¹⁴C-Formiat-Aufnahmerate via FocA in Hefezellen

Die Daten wurden mit einem 1 mM Gradienten erhoben und auf 1 mg getrocknete Hefe normalisiert. Mit pDRTXa transformierte Hefezellen dienten als Negativkontrolle. Pro Datenpunkt wurde eine Dreifachbestimmung von jeweils drei biologischen Replikaten durchgeführt. Die Fehlerbalken geben S.E.M. an.

4.3.2 Mediumalkalisierung während Formiataufnahme via FocA

Die Beobachtung der pH-Abhängigkeit ließ vermuten, dass bei der Substrataufnahme Protonen beteiligt sind. Um dies zu überprüfen, wurde der äußere pH-Wert einer Hefezellsuspension nach Zugabe von Formiat gemessen (Abb. 4.21). Es wurde die Differenz des gemessenen pH-Wertes zum pH-Wert am Zeitpunkt der Zugabe bestimmt. Der pH-Wert von 5,8 wurde so gewählt, dass Formiat außerhalb seiner eigenen Pufferkapazität liegt, um die Veränderungen des äußeren pH-Wertes nicht durch Puffereffekte zu verfälschen. Während nicht-exprimierende Hefezellen bei gegebenen Bedingungen nur eine geringe Änderung des äußeren pH-Wertes aufwiesen, kam es bei FocA-herstellenden Hefezellen zu einer Alkalisierung des Mediums mit einer initialen Aufnahmezeit von

$0,31 \Delta\text{pH min}^{-1}$. Eine Alkalisierung kommt durch den Entzug von Protonen aus dem Medium bzw. eine Aufnahme von Protonen in die Zellen über die Transporter zustande. Mit diesem Experiment konnte somit der Symport von Substrat mit Protonen in die Zellen gezeigt werden.

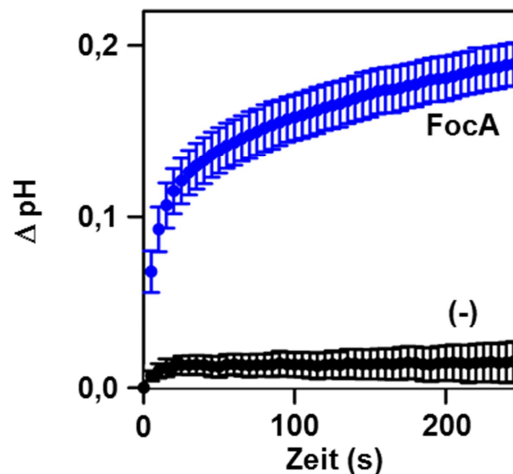


Abb. 4.21: Mediumalkalisierung nach Aufnahme von 20 mM Formiat in Hefezellen mit (blau) und ohne (schwarz, (-)) FocA-Herstellung

Die Fehlerbalken geben die S.E.M. von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei Replikaten an.

4.3.3 Inkubation von FocA mit Protonenentkopplern

Protonophore, auch Protonenentkoppler genannt, zerstören den Protonengradienten (McLaughlin & Dilger, 1980). Stoffe wie DNP und CCCP sind schwache Säuren, welche die biologische Membran passieren können und dabei Protonen mittragen (Abb. 4.22). Durch Zugabe dieser Stoffe kann überprüft werden, ob der Protonengradient die treibende Kraft für die Substrataufnahme ist oder ob die Aufnahme ausschließlich vom Protonierungsstatus des Substrates abhängt. Nach Inkubation von FocA-exprimierenden Hefezellen mit Protonenentkopplern war keine Aufnahme von Formiat sichtbar (Abb. 4.23). Dies spricht dafür, dass die Formiataufnahme vom Protonengradienten durch die biologische Membran angetrieben wird. Dadurch wird auch ausgeschlossen, dass der Membrantransport passiv und mit der undissoziierten Form des Substrates erfolgt.

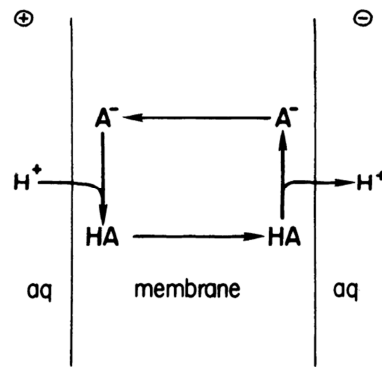


Abb. 4.22: Postulierter Mechanismus von Protonophoren, entnommen aus (McLaughlin & Dilger, 1980)

Protonophore zirkulieren als schwache Säuren innerhalb der physiologischen Membran und zerstören den Protonengradienten über die Membran.

(aq = *aqueous solvent*, HA = protonierte Säure, A⁻ = Säureanion, H⁺ = Proton)

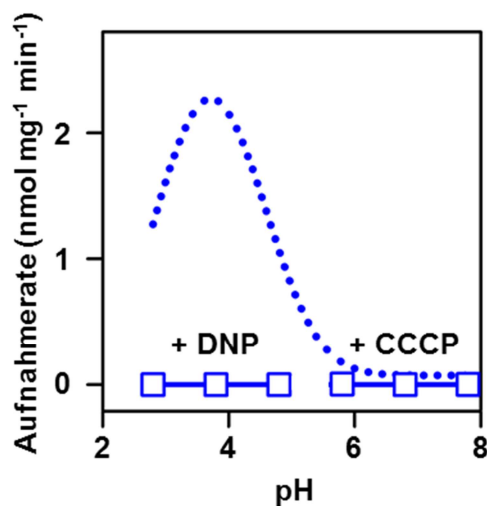


Abb. 4.23: Einfluss von Protonophoren auf die Substrataufnahme

Die gepunktete Linie zeigt die pH-abhängige Formiataufnahme via FocA ohne Inkubation mit Protonophoren. Es lag ein äußerer Gradient von 1 mM Formiat vor, die Zellen wurden auf 1 mg getrocknete Hefe normalisiert. Mit pDRTXa transformierte Hefezellen dienten als Negativkontrolle und wurden von den ermittelten Messwerten abgezogen. Die Fehlerbalken stellen S.E.M. aus drei Messungen von jeweils drei biologischen Replikaten dar.

4.3.4 Untersuchung der Protonierung mithilfe des Schwerwassereffektes

Um zu untersuchen, ob es während des Substrattransportes nur zu einem Protonierungsschritt kommt, bzw. um die Anzahl der Protonierungsschritte zu bestimmen, wurden Messungen mit schwerem Wasser (Deuteriumoxid) anstelle von wässrigem Puffer durchgeführt. Deuteriumoxid

enthält gegenüber Wasser anstelle von Protonen Deuteronen. Deuterium besteht im Atomkern aus einem Proton und einem Neutron und besitzt daher die doppelte Masse. Diese erhöhte Masse hat stärkere Molekülbindungen zur Folge, was wiederum zu einer erniedrigten Mobilität von Deuteronen führt. Experimentell konnte gezeigt werden, dass die Mobilität bzw. das Brechen einer Deuteriumbrückenbindung um 30 % gegenüber einer Wasserstoffbrückenbindung verringert ist (DeCoursey & Cherny, 1997). Kommt es also während des Transportprozesses eines Substrates über die physiologische Membran zu einer einzigen Protonierung, sollte die gemessene Aufnahme um etwa 30 % reduziert sein. Ist eine Protonierungskaskade („*proton relay*“) an dem Substrattransport beteiligt, multipliziert sich dieser Effekt und die Aufnahme wird stark verringert. Pufferlösungen wurden sowohl in schwerem Wasser als auch in *Aqua bidest.* hergestellt (3.3.1.2), Zellen im jeweiligen Medium suspendiert und pH-Profile erstellt (Abb. 4.24). Während im neutralen äußeren Medium bei gegebener Assayauflösung keine Unterschiede zu erkennen waren, reduzierte sich die maximale Rate im Säuren signifikant um 35 % (H_2O : $2,23 \text{ nmol mg}^{-1}$, D_2O : $1,43 \text{ nmol mg}^{-1}$). Dieses Ergebnis schließt eine Protonierungskaskade aus – vielmehr spricht dies für einen einfachen Protonierungsschritt während des Substrattransports. Durch dieses Ergebnis ist noch nicht ersichtlich, ob an der Protonierung des Substrates das Protein selbst oder das Lösungsmittel beteiligt ist.

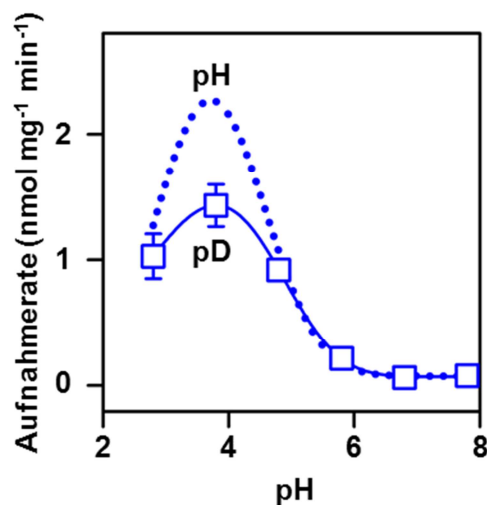


Abb. 4.24: Einfluss des Schwerwassereffektes auf pH-abhängige Formiataufnahme via FocA Initiale Aufnahmeraten wurden bei verschiedenen pH/pD-Werten im wässrigen und Deuteriumoxid-Puffer gemessen. Die gestrichelte Linie zeigt die Formiataufnahme in wässrigem Puffer. Es lag ein äußerer Gradient von 1 mM Formiat vor. Mit pDRTXa transformierte Hefezellen dienen als Negativkontrolle und wurden von den ermittelten Messwerten abgezogen. Die Messdaten setzen sich aus drei biologischen Replikaten mit jeweils drei Messungen zusammen. Die Fehlerbalken stellen S.E.M. dar.

4.3.5 Bestimmung der Substrataffinität

Für die Bestimmung der Substrataffinität wurden initiale Aufnahmezeiten bei verschiedenen Formiatkonzentrationen bei pH 6,8 gemessen. Die Substrataffinität eines Transporters wird über die Michaeliskonstante definiert, welche die Substratkonzentration angibt, bei der die Transportgeschwindigkeit v_{\max} halbmaximal ist (Michaelis & Menten, 1913).

Eine Sättigung des Transports erfolgte erst bei sehr hohen Konzentrationen mit einer Affinitätskonstante $K_m = 119 \pm 32$ mM und $v_{\max} = 12,2 \pm 1,8$ nmol mg⁻¹ min⁻¹. Diese niedrige Affinität ist untypisch für Transporter und zeigt kanalartige Eigenschaften der FNTs. Für die Funktionalität der FNTs ist eine niedrige Affinität physiologisch sinnvoll, da es verhindert, dass Anionen von starken, nicht protonierbaren Säuren wie Chlorid den Transport der physiologischen Substrate verhindert.

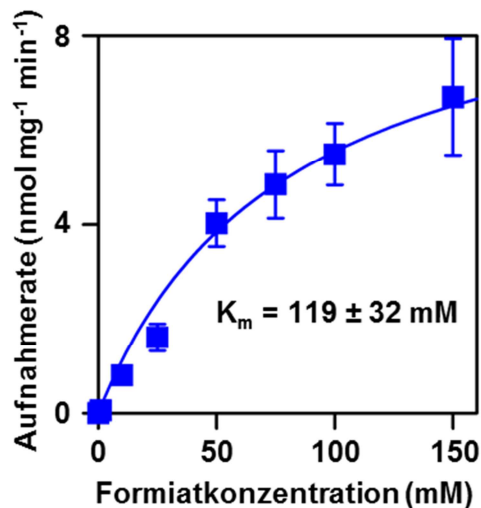


Abb. 4.25: Bestimmung der Affinität von Formiat zu FocA bei pH 6,8

Es wurde die ¹⁴C-Formiataufnahme bestimmt und die erhaltenen Messwerte auf 1 mg getrocknete Hefe normalisiert. Mit pDRTXa transformierte Hefezellen dienten als Negativkontrolle und wurden von den ermittelten Messwerten abgezogen. K_m und v_{\max} wurden mit der Lineweaver-Burk-Korrelation bestimmt (3.3.1.3). Die Daten sind aus drei biologischen Replikaten erhoben worden. Die Fehlerbalken stellen S.E.M. dar.

4.3.6 Einfluss von Salzen auf die Substrataufnahme

Um den möglichen Einfluss von nicht physiologischen Ionen im Medium zu überprüfen, wurde dem normalen Messpuffer 100 mM NaCl hinzugefügt. Der Zusatz dieser hohen, aber noch physiologischen Konzentration zeigte keine kompetitive Inhibition der Chloridionen auf die Formiataufnahme. Der Zusatz von 100 mM Natriumgluconat als nicht permeierende Spezies im

Puffer hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Transportrate und zeigte, dass auch osmotische Veränderungen keinen Einfluss auf die Formiataufnahme haben.

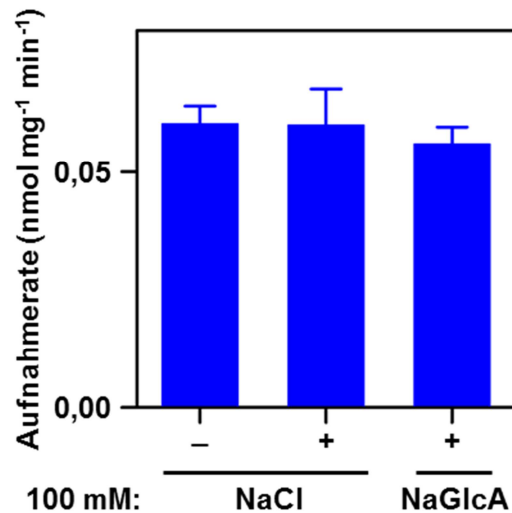


Abb. 4.26: Initiale Aufnahmeraten von Formiat via FocA (pH 6,8) mit und ohne Pufferzusätzen
 Es wurden 100 mM NaCl bzw. 100 mM Na-Gluconat dem Substratpuffer hinzugefügt. Die ¹⁴C-Formiataufnahme (Gradient 1 mM Formiat) wurde bestimmt und die erhaltenen Messwerte auf 1 mg getrocknete Hefe normalisiert. Mit pDRTXa transformierte Hefezellen dienten als Negativkontrolle und wurden von den ermittelten Messwerten abgezogen. Die Fehlerbalken stellen S.E.M. dar und ergeben sich aus zwei biologischen Replikaten mit jeweils drei Messwerten. Die Werte zeigen keine signifikanten Unterschiede (*analysis of variance*; $\alpha = 5\%$).

4.3.7 Untersuchung der pH-Abhängigkeit im *E. coli*-System

Es wurde überprüft, ob die zuvor in Hefen beobachtete pH-Abhängigkeit auch im physiologischen System von FocA, *E. coli*, zu sehen ist. Dazu wurden BL21-Zellen gewählt, welche für die rekombinante Expression verwendet wurden. Über die T7-Bakteriophage wurde das T7-RNA-Polymerase Gen in die genomische DNA integriert (Studier et al, 1990). Der Vektor pET21X enthält zwischen dem T7-Promotor und dem FocA-Gen ein Laktose-Operon. Die BL21 (DE3) pRep4-Zellen enthalten zusätzlich das pRep4-Plasmid, welches für den Lac-Repressor kodiert. Dieser bindet im *lac*-Operon-Bereich und verhindert somit das Ablesen des Zielgens. Durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG), welches den *lac* Repressor bindet, erfolgt die gezielte Induktion der Genexpression (Jacob & Monod, 1961).

Die Herstellung von FocA erfolgte wie in 3.4 beschrieben. Als Negativkontrolle wurden Zellen nicht mit IPTG behandelt, um die selektive Proteinproduktion zu überprüfen. Die Herstellung von FocA

konnte mittels Western Blot-Analyse bestätigt werden (Abb. 4.27 A), nicht induzierte Zellen zeigten dabei keine unspezifischen Banden. Der Substrataufnahmeassay wurde zunächst bei pH 6,8 mit Formiat durchgeführt. Dabei war kein Unterschied zwischen induzierten und nicht-induzierten Zellen zu erkennen. Im sauren Medium zeigten induzierte Zellen allerdings eine wesentlich höhere Formiataufnahme als nicht-induzierte Zellen. Die generell sehr niedrigen Formiat-Aufnahmeraten lassen sich durch die Funktion membranständiger Enzyme (Formiatdehydrogenasen) als auch zytosolischer Enzyme (Formiat-Hydrogen-Lyasen) erklären, die Formiat im physiologischen pH-Bereich schnell in CO_2 und Wasserstoff umsetzen, welches wiederum aus den Zellen diffundieren kann und somit zum Verlust der ^{14}C -Markierung führt (Stephenson & Stickland, 1932; Sawers, 1994, Abb. 1.1). Aus diesem Grund wurde zusätzlich der Transport von Acetat untersucht, welches nach Aufnahme vor allem über den Zitronensäurezyklus verstoffwechselt und nicht in CO_2 umgesetzt wird. Hier konnte eine deutliche Substrataufnahme bei neutralem pH-Wert beobachtet werden, die im aziden Milieu stark anstieg. Diese Ergebnisse zeigten, dass es auch im physiologischen *E.coli*-System in saurer Umgebung zu einer erhöhten Aufnahme in die Zellen kommt. Dies widerlegt erneut den zuvor postulierten *gating*-Mechanismus, welcher von einem plötzlichen, abnehmenden Transport im sauren Milieu ausging (Lü et al, 2012a; Lü et al, 2011).

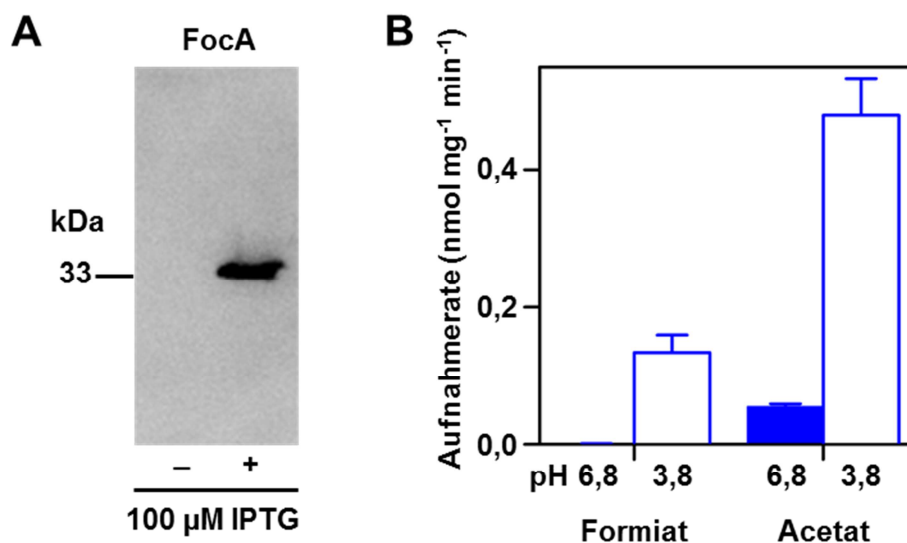


Abb. 4.27: Nachweis von FocA in *E. coli* BL21-Zellen; pH-abhängige Substrataufnahmepprofile
 (A) Zellen wurden wie in 3.4 beschrieben induziert und lysiert. Es wurden jeweils 30 μg der Gesamtproteinfraktion aufgetragen. Es erfolgte eine Detektion des C-terminalen 10x-His-tag mit dem α -Penta-His-Antikörper.
 (B) Induzierte und nicht-induzierte Zellen wurden unter gleichen Bedingungen vermessen. Der äußere Substratgradient war 1 mM Formiat oder Acetat. Nach Auswertung der Rohdaten wurden die Werte der nicht-induzierten Zellen abgezogen. Die Daten wurden aus drei biologischen Replikaten mit jeweils drei Messwerten erstellt und die Fehlerbalken stellen S.E.M. dar.

4.4 Transportmechanismus der FNTs

Wie unter 1.4 beschrieben, ist es aufgrund der energetischen Barriere sehr unwahrscheinlich, dass Substrate die lipophilen Engstellen als geladene Anionen passieren. Aus diesem Grund wurde analysiert, welche Aminosäuren entlang des Transportpfades in Frage kommen, an der Protonierung oder der Anziehung der Substratanionen beteiligt zu sein. Dabei wurden vier Aminosäuren, die innerhalb der FNTs stark konserviert sind, identifiziert (Abb. 4.28, Abb. 4.29):

1. Das bereits erwähnte zentrale Histidin liegt zwischen den Konstriktionsstellen und bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem fixierten Wassermolekül innerhalb des Proteins.
 2. Ein Threonin liegt innerhalb der zytoplasmischen Konstriktion und fixiert ebenfalls das genannte Wassermolekül über eine Wasserstoffbrückenbindung.
 3. Im Poreneingang liegt ein konserviertes Lysin; eine Kristallstruktur des Formiattransporters aus *Salmonella typhimurium* (PDB # 3Q7K, (Lü et al, 2011)) zeigt hier ein angelagertes Formiat in Wasserstoffbrückendistanz zum Lysin.
 4. Benachbart zum Lysin ist ein Glutamat, welches eine Salzbrücke zu diesem bildet.
- Durch Mutationsanalysen wurde die Rollen dieser Aminosäuren untersucht.

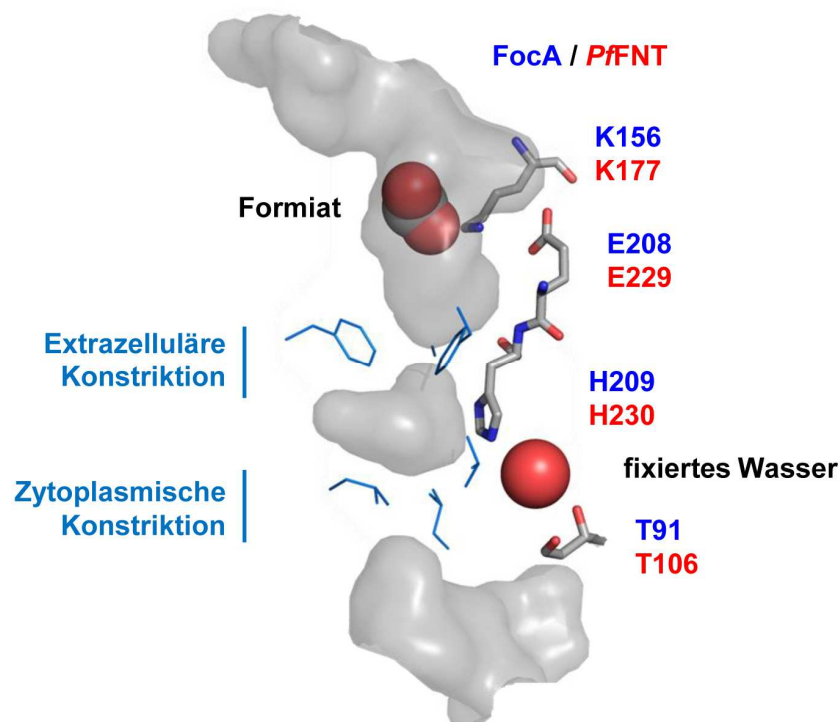


Abb. 4.28: Seitenansicht eines Monomers von FocA (PDB # 3Q7K)

In blau sind die konstriktionsbildenden Aminosäuren, in grau sind konservierte Aminosäuren entlang des Transportpfades dargestellt. Ein mitkristallisiertes Formiatanion ist im Kalottenmodell zu sehen. Die graue Schattierung zeigt den lösungsmittelzugänglichen Raum an.

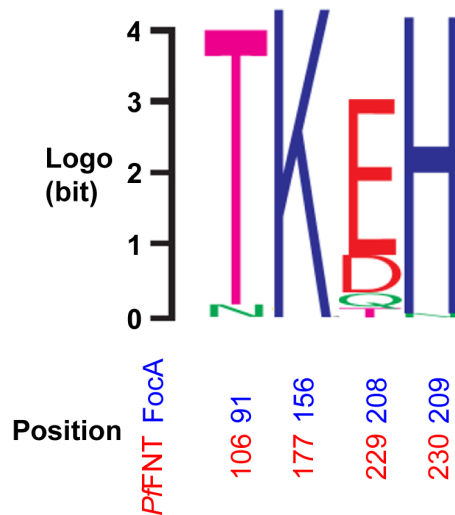


Abb. 4.29: Subfamily-Sequenzlogo ausgewählter Aminosäuren in FNTs

Darstellung der Konservierung einzelner Aminosäuren; über die Größe wird die Häufigkeit dieser Aminosäure dargestellt. Das Alignment wurde basierend auf 71 FNT-Sequenzen erstellt. Für die grafische Darstellung wurde TEXshade[®] verwendet.

4.4.1 Herstellung von FocA- und PfFNT-Mutanten in *S. cerevisiae*

Einzelne Punktmutationen wurden mittels Mutagenese-PCR (3.1.14) in die DNA eingebracht und Hefezellen mit der DNA transformiert. Die Herstellung des Proteins wurde durch Isolierung der mikrosomalen Fraktion und durch Western Blot-Analyse überprüft. Alle Konstrukte wurden erfolgreich und in vergleichbarem Maße hergestellt (Abb. 4.30, Abb. 4.31).

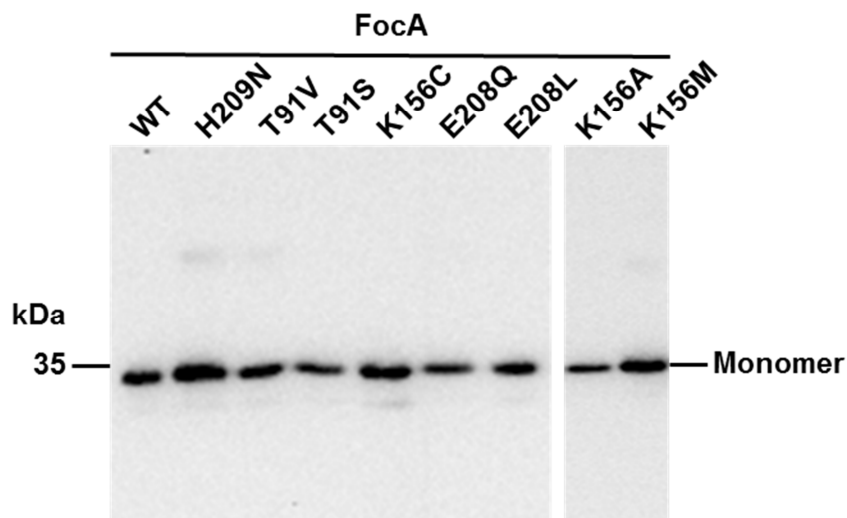


Abb. 4.30: Western Blot-Analyse der mikrosomalen Fraktion von FocA Wildtyp und Mutanten, hergestellt in *S. cerevisiae*

Es wurde der α -Penta-His-Antikörper zur Analyse eingesetzt.

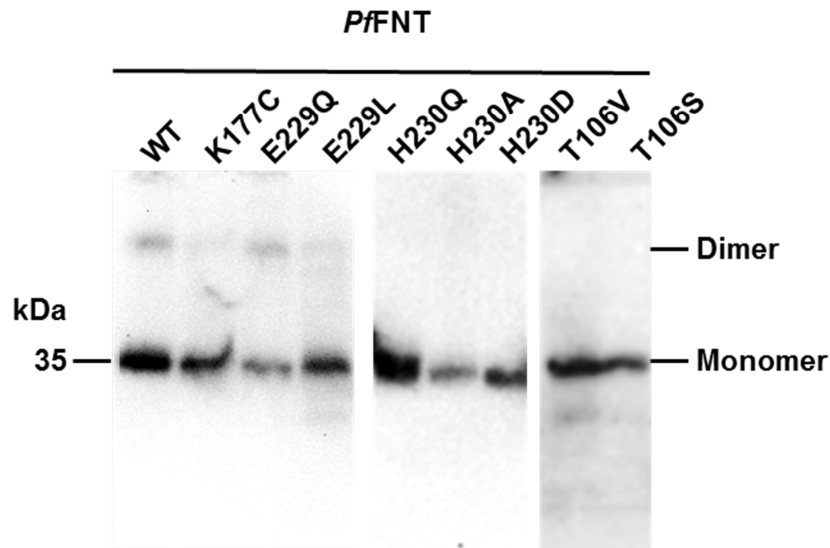


Abb. 4.31: Western Blot-Analyse der mikrosomalen Fraktion von *PfFNT* Wildtyp und Mutanten, hergestellt in *S. cerevisiae*

Es wurde der α -HA-Antikörper zur Analyse eingesetzt.

4.4.2 Mutationsanalysen innerhalb der lipophilen Konstriktionen

Zunächst wurde die Rolle des zentralen Histidins untersucht. Das Histidin wurde in FocA zu einem Asparagin geändert (H209N, Abb. 4.32). Asparagin ist eine polare, jedoch ungeladene Aminosäure, die weiterhin in der Lage sein sollte, eine Wasserstoffbrückenbindung zum fixierten Wasser zu bilden. Außerdem gibt es eine FNT-Struktur im eukaryotischen Organismus *Entamoeba histolytica*, welche an dieser Position natürlicherweise ein Asparagin aufweist. FocA H209N war nicht funktionell, was für eine essentielle Rolle des Histidins für den Transport spricht. Dieses Ergebnis gibt jedoch keine Aussage darüber, ob das Histidin aus rein strukturellen Gründen essentiell ist, oder ob es an der Protonierung des Substratanions beteiligt ist. Es wurden weitere Mutanten von *PfFNT* hergestellt, um weitere Erkenntnisse über die Funktion des Histidins zu gewinnen (Abb. 4.33). Ein Austausch des Histidins zu einem Glutamin (H230Q), welches ebenso wie das Asparagin ungeladen und polar ist, jedoch ein ähnliches Aminosäurevolumen zum Histidin besitzt, führte ebenfalls zum Verlust der Funktion. Auch der Austausch durch ein lipophiles Alanin (H230A) oder ein negativ geladene Aspartat (H230D) zeigten einen Verlust der Funktion. Somit konnten hier keine weiteren mechanistischen Erkenntnisse gewonnen werden.

Darüber hinaus wurde die Rolle des benachbarten Threonins im Ω -loop zunächst in FocA untersucht (Abb. 4.32). Diese polare, ungeladene Aminosäure wurde durch ein Valin getauscht (T91V), somit kam es zu einem Austausch der Hydroxyl- durch eine Methylgruppe in der Seitenkette. Valin ist nicht mehr in der Lage, eine Wasserstoffbrückenbindung zum Wasser zu bilden. Dieser Aminosäureaustausch führte zu einem Verlust der Transportfunktion, die entsprechende Mutante in *PfFNT* (T106V) zeigte ebenfalls einen Funktionsverlust (Abb. 4.33). Anschließend wurde das Threonin zu einem Serin mutiert (T91S). Dieser konservative Austausch hat einzig ein Fehlen einer Methylgruppe in der Seitenkette zur Folge, die Polarität und die Fähigkeit der Wasserstoffbrückenbindung bleiben bestehen. Die FocA T91S-Mutante zeigte das gleiche pH-abhängige Transportverhalten wie der Wildtyp. Im Laktattransporter *PfFNT* führte der Austausch T106S zu einer leicht abgeschwächten Funktion in der pH-Abhängigkeit.

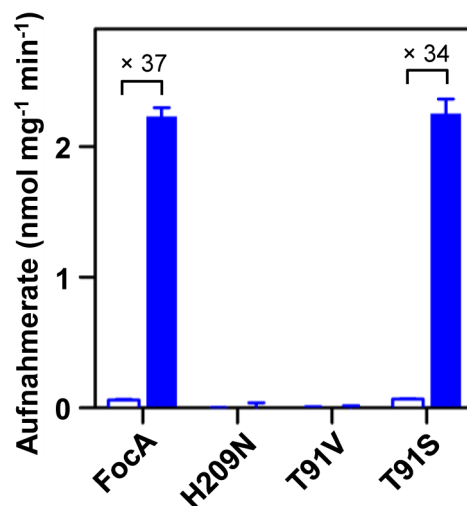


Abb. 4.32: Formiatleitfähigkeit via FocA Wildtyp und Mutanten bei pH 6,8 (offene Balken) und pH 3,8 (geschlossene Balken)

Es wurde die ^{14}C -Formiataufnahme (Gradient: 1 mM) bestimmt und die erhaltenen Messwerte auf 1 mg getrocknete Hefe normalisiert. Mit pDRTXa transformierte Hefezellen dienten als Negativkontrolle und wurden von den ermittelten Messwerten abgezogen. Die Fehlerbalken stellen S.E.M. dar und ergeben sich aus drei biologischen Replikaten mit jeweils drei Messwerten. Bei funktionellen Transportern ist das Ratenverhältnis (pH 3,8 / pH 6,8) angegeben.

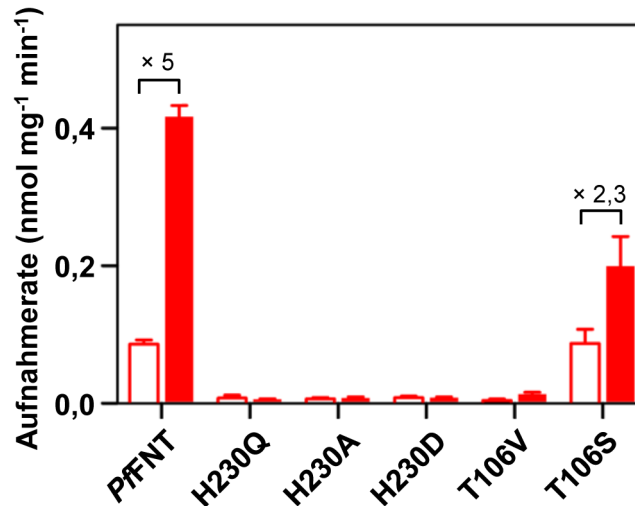


Abb. 4.33: L-Laktatleitfähigkeit via *PfFNT* Wildtyp und Mutanten bei pH 6,8 (offene Balken) und pH 3,8 (geschlossene Balken)

Es wurde die ^{14}C -L-Laktataufnahme (Gradient: 1 mM) bestimmt und die erhaltenen Messwerte auf 1 mg getrocknete Hefe normalisiert. Mit pDRTXa transformierte Hefezellen dienten als Negativkontrolle und wurden von den ermittelten Messwerten abgezogen. Die Fehlerbalken stellen S.E.M. dar und ergeben sich aus drei biologischen Replikaten mit jeweils drei Messwerten. Bei funktionellen Transportern ist das Ratenverhältnis (pH 3,8 / pH 6,8) angegeben.

4.4.3 Mutationsanalysen im Poreneingang

Es ist energetisch wesentlich günstiger, wenn die Protonierung des Anions stattfindet, bevor das Substrat die lipophilen Engstellen passiert.

Daher wurde die Funktion des konservierten, im Poreneingang liegenden Lysins untersucht (Abb. 4.34). Dazu wurde das Lysin zunächst zu einem Cystein mutiert (K156C), um die positive Ladung zu eliminieren. Die Mutante FocA K156C zeigte im neutralen pH-Bereich keine veränderte Aufnahme rate gegenüber dem Wildtyp, jedoch stieg die Aufnahme rate im sauren Milieu nur um das 6-fache, während der Wildtyp eine 37-fach erhöhte Aufnahme im Vergleich zu pH 6,8 zeigte; somit war die pH-Abhängigkeit stark eingeschränkt. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt aufgrund der starken Veränderung der Aminosäuregröße beruht, wurde das Lysin zum einen zu Alanin (K156A) und zum anderen zu Methionin (K156M) verändert, welches die gleiche Größe des Lysins besitzt, jedoch ungeladen ist. Beide Mutanten zeigten das gleiche Verhalten wie die Cysteinmutante (Abb. 4.34). Die analoge Mutation K177C in *PfFNT* hatte einen Funktionsverlust des Transporters zur Folge (Abb. 4.35). Diese Mutationsanalysen zeigen, dass die positive Ladung des Lysins für die pH-Abhängigkeit des Transporters verantwortlich ist.

Aufgrund der entscheidenden Rolle des Lysins im Poreneingang für den Transport, wurde ebenso die Funktion des interagierenden Glutamats untersucht (Abb. 4.34, Abb. 4.35). Diese negativ

geladene Aminosäure bildet eine geladene Wasserstoffbrückenbindung zum ϵ -Stickstoff des Lysins, wodurch dieses stabilisiert wird. Der Austausch des Glutamats zu einem polaren, aber ungeladenem Glutamin mit gleicher Größe zeigte in FocA (E208Q) keinen Funktionsunterschied in der pH-Abhängigkeit gegenüber dem Wildtyp. Hier bestand weiterhin die Fähigkeit der Bildung einer H-Brückenbindung. Wurde Glutamat durch ein lipophiles Leucin (E208L) ausgetauscht, ergab sich ein Verlust der Funktion, da offensichtlich keine Wasserstoffbrückenbindung gebildet werden konnte. Die entsprechenden Mutanten von *PfFNT*, E229Q und E229L, wurden ebenfalls untersucht. E229Q zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine leicht erniedrigte Leitfähigkeit bei pH 3,8. Der Austausch des Glutamats zu einem Leucin zeigte ebenfalls einen Funktionsverlust sowohl im neutralen als auch sauren pH-Bereich. Dies spricht für eine essentielle Rolle des Glutamats aufgrund seiner stabilisierenden Funktion für das Lysin.

Benachbart zum Glutamat liegt ein konserviertes Asparagin (N213 in FocA), sodass sich eine Salzbrückentriade Lys-Glu-Asn ausbildet (Czyzewski & Wang, 2012). Es ist davon auszugehen, dass das Asparagin ebenso wie das Glutamat eine entscheidende Rolle für die Stabilisierung des Lysins besitzt, dies bedarf jedoch einer weiteren Evaluierung. N213 sowie das ebenfalls benachbarte N254 liegen hoch konserviert vor.

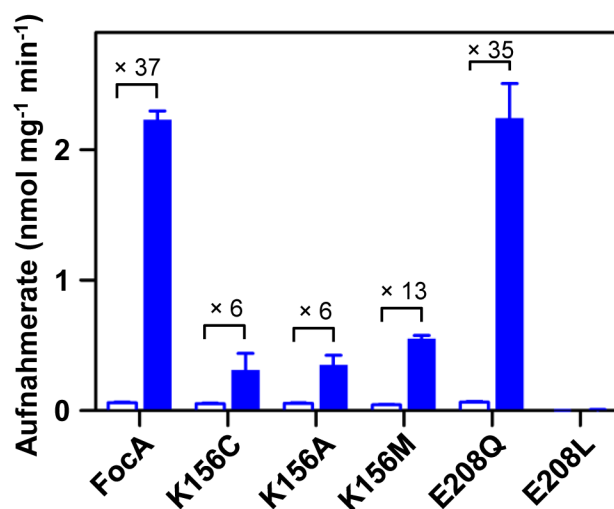


Abb. 4.34: Formiatleitfähigkeit via FocA Wildtyp und Mutanten bei pH 6,8 (offene Balken) und 3,8 (geschlossene Balken)

Es wurde die ¹⁴C-Formiataufnahme (Gradient: 1 mM) bestimmt und die erhaltenen Messwerte auf 1 mg getrocknete Hefe normalisiert. Mit pDRTXa transformierte Hefezellen dienen als Negativkontrolle und wurden von den ermittelten Messwerten abgezogen. Die Fehlerbalken stellen S.E.M. dar und ergeben sich aus drei biologischen Replikaten mit jeweils drei Messwerten. Bei funktionellen Transportern ist das Ratenverhältnis (pH 3,8 / pH 6,8) angegeben.

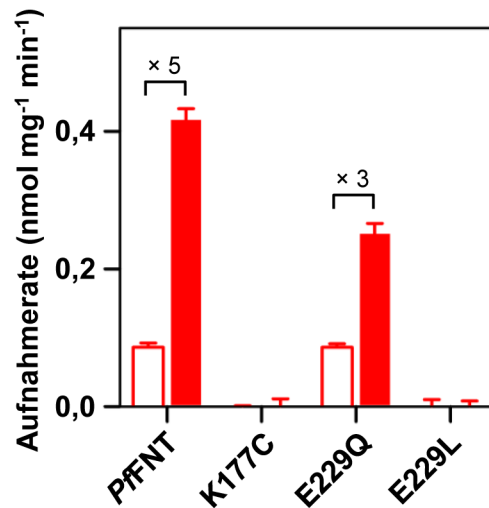


Abb. 4.35: L-Laktatfähigkeit via PfFNT Wildtyp und Mutanten bei pH 6,8 (offene Balken) und 3,8 (geschlossene Balken)

Es wurde die ¹⁴C-L-Laktataufnahme (Gradient: 1 mM) bestimmt und die erhaltenen Messwerte auf 1 mg getrocknete Hefe normalisiert. Mit pDRTXa transformierte Hefezellen dienen als Negativkontrolle und wurden von den ermittelten Messwerten abgezogen. Die Fehlerbalken stellen S.E.M. dar und ergeben sich aus drei biologischen Replikaten mit jeweils drei Messwerten. Bei funktionellen Transportern ist das Ratenverhältnis (pH 3,8 / pH 6,8) angegeben.

Weiterhin wurde die mögliche Rolle der Substranziehung von Histidinen, welche in der Nähe des Poreneingangsbereiches liegen, untersucht (Abb. 4.36). H155 und H159 befinden sich in der extrazellulären Schleife zwischen TM3 und 4. Es wurden FocA H155A und FocA H159N in Hefen hergestellt und die Funktion bei pH 3,8 und 6,8 überprüft. Die Aufnahmeleistungen haben sich dabei nicht signifikant von denen des Wildtyps unterschieden (t-Test, $P < 0,05$).

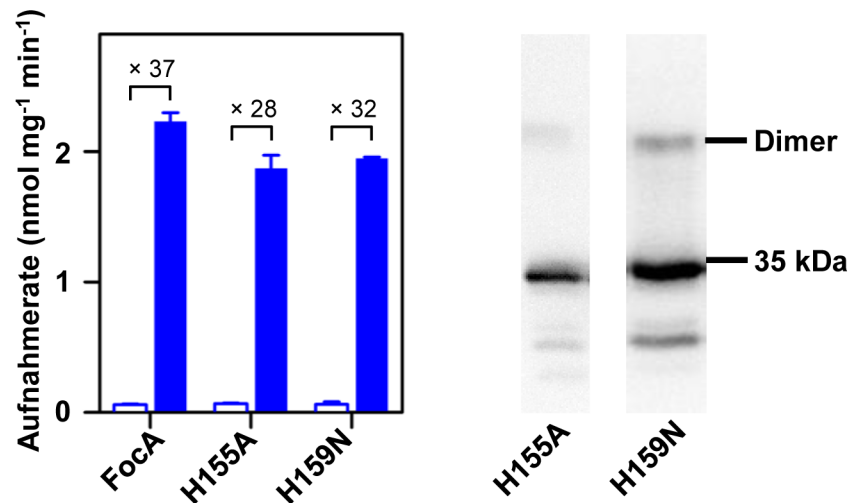


Abb. 4.36 Formiatleitfähigkeit via FocA Wildtyp und Mutanten bei pH 6,8 (offene Balken) und 3,8 (geschlossene Balken)

Es wurde die ¹⁴C-Formiataufnahme (Gradient: 1 mM) bestimmt und die erhaltenen Messwerte auf 1 mg getrocknete Hefe normalisiert. Mit pDRTXa transformierte Hefezellen dienen als Negativkontrolle und wurden von den ermittelten Messwerten abgezogen. Die Fehlerbalken stellen S.E.M. dar und ergeben sich aus drei biologischen Replikaten mit jeweils drei Messwerten. Es ist das Ratenverhältnis (pH 3,8 / pH 6,8) angegeben. Rechts ist der Proteinnachweis im Western Blot dargestellt. Es wurde der α -HA-Antikörper eingesetzt.

4.4.4 Anziehung von Substratanionen durch das Lysin im Poreneingang

Um die genaue Rolle des Lysins im Poreneingang zu analysieren, wurde zunächst die Poisson-Boltzmann-Elektrostatik wie unter 3.5.2 berechnet und der Poreneingang betrachtet (Abb. 4.37). Der Formiattransporter hat ein leicht positives elektrostatisches Feld am Poreneingang. Dazu tragen die positive Ladung des Lysins und möglicherweise das zentrale Histidin sowie Histidine an der Oberfläche (H155, H159) bei. Formiatanionen werden demnach vom Poreneingang angezogen. Liegt anstelle des Glutamats ein Glutamin in Nachbarschaft zum Lysin, kommt die volle positive Ladung des Lysins zum Tragen, sodass der Poreneingang stark positiv geladen ist. Ändert man das Lysin zu einem ungeladenen Cystein, ist im Poreneingang die negative Ladung des Glutamats vorrangig, sodass Formiatanionen nicht mehr angezogen werden können.

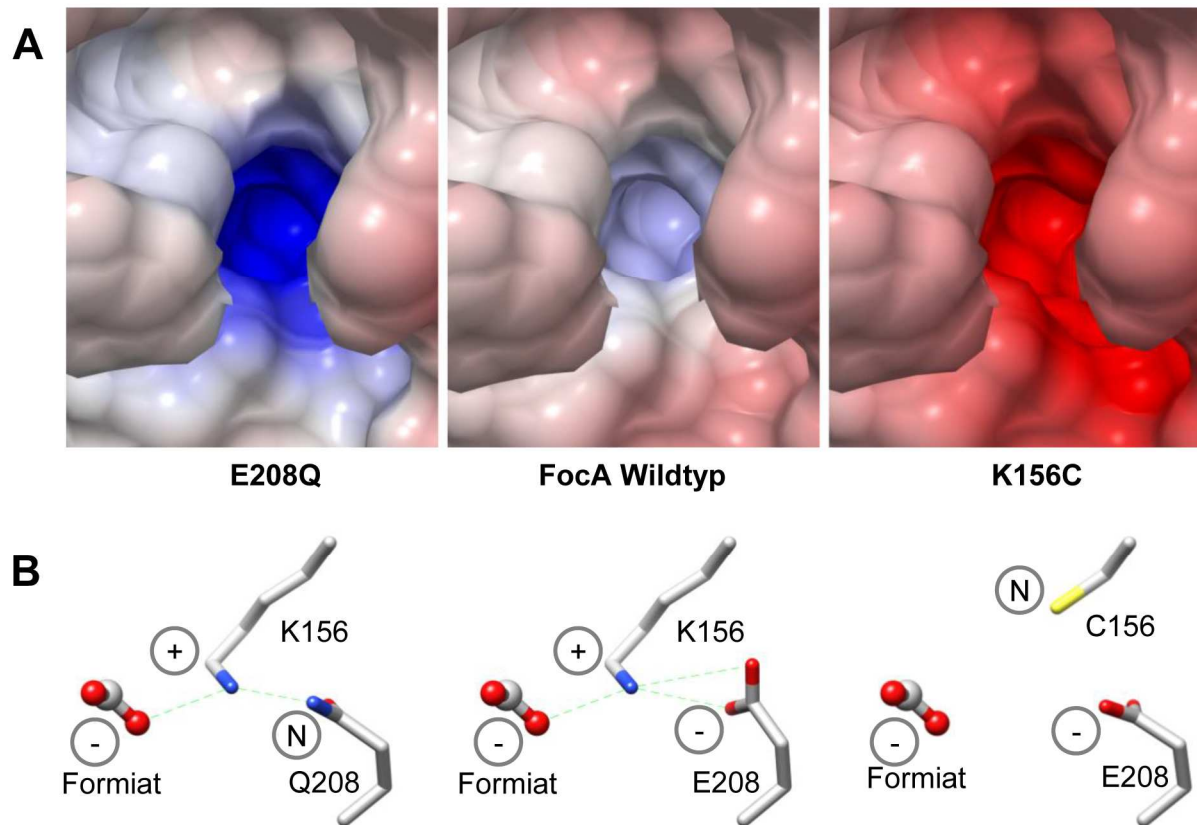


Abb. 4.37: Poisson-Boltzmann-elektrostatische Profile von FocA Wildtyp und den Mutanten E208Q und K156C sowie dazugehörige schematische Ladungsverteilungen im Poreneingang (A) Aufsicht auf den Poreneingang von FocA Wildtyp im Vergleich zu den Mutanten E208Q und K156C (PDB # 3Q7K). Die Poisson-Boltzmann-elektrostatischen Potentiale (blau: positiv, rot: negativ) wurden mit der APBS-Funktion berechnet. Die hier dargestellten Bilder wurden von Prof. Dr. Eric Beitz zur Verfügung gestellt. (B) Seitenansichten der dazugehörigen Ladungsverteilung zwischen einem Poreneingang liegenden Formiatanion, K156 und E208 sowie Mutanten. Alle Abbildungen wurden mit Chimera® erstellt.

Diese elektrostatischen Unterschiede im Poreneingang wurden auf funktionelle Konsequenzen geprüft. Dazu wurde ein pH-abhängiges Profil der Formiataufnahme via FocA K156C erstellt (Abb. 4.38). Ein leichter Anstieg der Aufnahme erfolgte erst im sehr sauren Milieu – betrachtet man den pK_S -abhängigen Anteil der protonierten Substratform, Ameisensäure, steht der Transportanstieg mit diesem im Verhältnis. Dies lässt darauf schließen, dass die protonierte, neutrale Form den Transporter passieren kann, während Formiatanionen von der negativen Oberfläche des Poreneingangs aktiv abgestoßen werden.

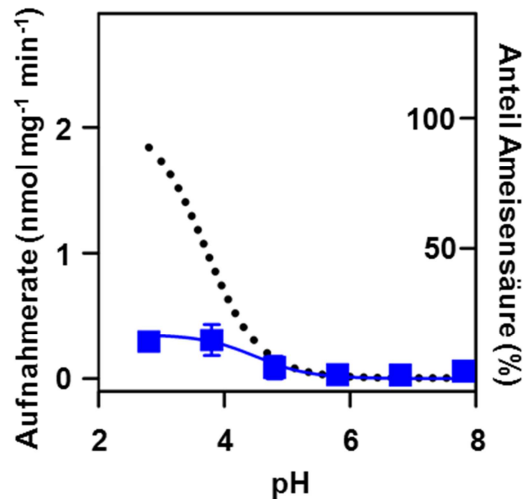


Abb. 4.38: pH-abhängige Formiataufnahme via FocA-K156C

Aufnahmeraten wurden bei verschiedenen pH-Werten aufgenommen (1 mM Gradient). Mit pDRTXa transformierte Hefezellen dienten als Negativkontrolle und wurden von den erhaltenen Messwerten abgezogen. Es wurden Dreifachbestimmungen von drei biologischen Replikaten durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen S.E.M. dar. Die schwarz gepunktete Linie gibt den Anteil der protonierten Substratform Ameisensäure an.

Anschließend wurde versucht, die Affinitätskonstante K_m von FocA K156C-Mutante zu bestimmen. Da die Affinität jedoch sehr gering ist, konnte der K_m -Wert nicht genau bestimmt, sondern nur auf > 200 mM geschätzt werden (Abb. 4.39).

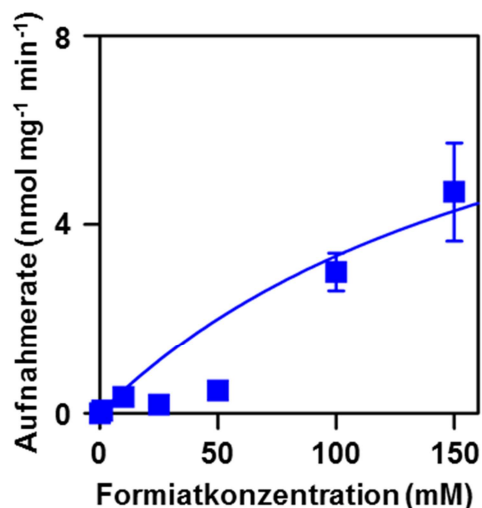


Abb. 4.39: Bestimmung der Affinität von Formiat zu FocA K156C bei pH 6,8

Es wurde die ^{14}C -Formiataufnahme bestimmt und die erhaltenen Messwerte auf 1 mg getrocknete Hefe normalisiert. Mit pDRTXa transformierte Hefezellen dienten als Negativkontrolle und wurden von den ermittelten Messwerten abgezogen. Die Daten sind aus drei biologischen Replikaten mit jeweils drei Messwerten erhoben worden. Die Fehlerbalken stellen S.E.M. dar.

Der Austausch des Glutamats zu einem Glutamin im Poreneingang sorgt für eine erhöhte positive Ladung und könnte dadurch gegebenenfalls besser Substratanionen anziehen. Aus diesem Grund wurde das pH-Profil der FocA E208Q-Mutante ermittelt (Abb. 4.40), dieses zeigte im Vergleich zum Wildtyp jedoch keinen Unterschied.

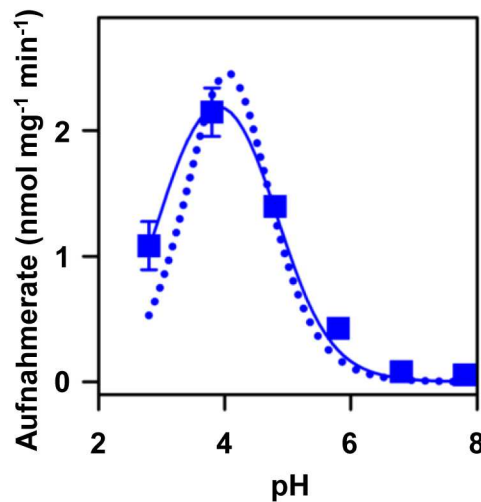


Abb. 4.40: pH-abhängige Formiataufnahme via FocA-E208Q

Aufnahmeraten wurden bei verschiedenen pH-Werten aufgenommen (1 mM Gradient). Bei gleichen pH-Werten wurden nicht-exprimierende Zellen ebenfalls vermessen und die erhaltenen Werte von denen des Transporters abgezogen. Die gepunktete Linie zeigt die Formiataufnahme des Wildtyps. Es wurden Dreifachbestimmungen von drei biologischen Replikaten durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen S.E.M. dar.

Beim Ermitteln der Substrataffinität zeigte sich ein erniedrigter K_m -Wert von 51 mM gegenüber dem FocA-Wildtyp mit einer Substrataffinität von 120 mM. Dieser Effekt der verstärkten Affinität wird jedoch durch eine verminderte Maximalgeschwindigkeit von $7,7 \pm 1,2 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ausgeglichen ($v_{\max}(\text{Wildtyp}) = 12,2 \pm 1,8 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Daraus erklärt sich das wildtypische Verhalten in der pH-Abhängigkeit.

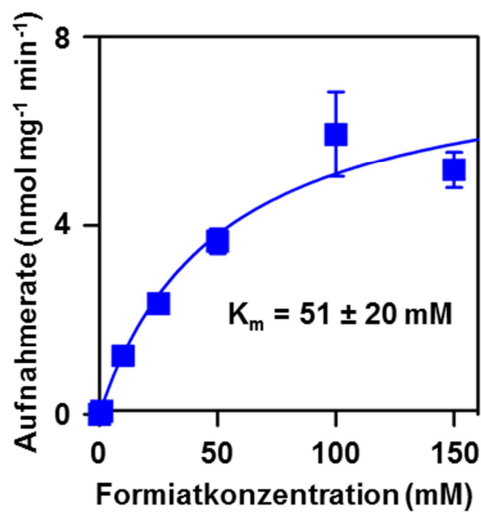


Abb. 4.41: Bestimmung der Affinität von Formiat zu FocA E208Q bei pH 6,8

Es wurde die ¹⁴C-Formiataufnahme bestimmt und die erhaltenen Messwerte auf 1 mg getrocknete Hefe normalisiert. Mit pDRTXa transformierte Hefezellen dienten als Negativkontrolle und wurden von den ermittelten Messwerten abgezogen. K_m und v_{max} wurden mit der Lineweaver-Burk-Korrelation bestimmt (3.3.1.3). Die Daten sind aus drei biologischen Replikaten mit jeweils drei Messwerten erhoben worden. Die Fehlerbalken stellen S.E.M. dar.

Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass das im Poreneingang liegende, konservierte Lysin aufgrund des elektrostatischen Effektes dafür verantwortlich ist, Substratanionen anzuziehen. Jedoch konnten diese Untersuchungen noch nicht klären, wo und wie die Protonierung des Anions stattfindet, bevor es die lipophilen Engstellen passiert.

4.4.5 Rolle des N-Terminus für den Transportmechanismus

Da dem N-Terminus eine wichtige Rolle für den postulierten *gating*-Mechanismus zugeschrieben wird (Lü et al, 2012a; Feng et al, 2012), wurden verschiedene N-terminal verkürzte Konstrukte von FocA hergestellt (3.1.17). FocA besitzt im N-Terminus an den Positionen 2, 16, 26 und 29 Lysine, welche jedoch innerhalb der FNTs nicht konserviert sind. Es wurden Mutanten hergestellt, bei denen jeweils an den Positionen 16, 26 und 29 das Lysin durch ein Alanin ausgetauscht wurde, um deren mögliche Rolle für die Substratanziehung näher zu untersuchen. Alle Konstrukte konnten erfolgreich in Hefezellen hergestellt werden (Abb. 4.42).

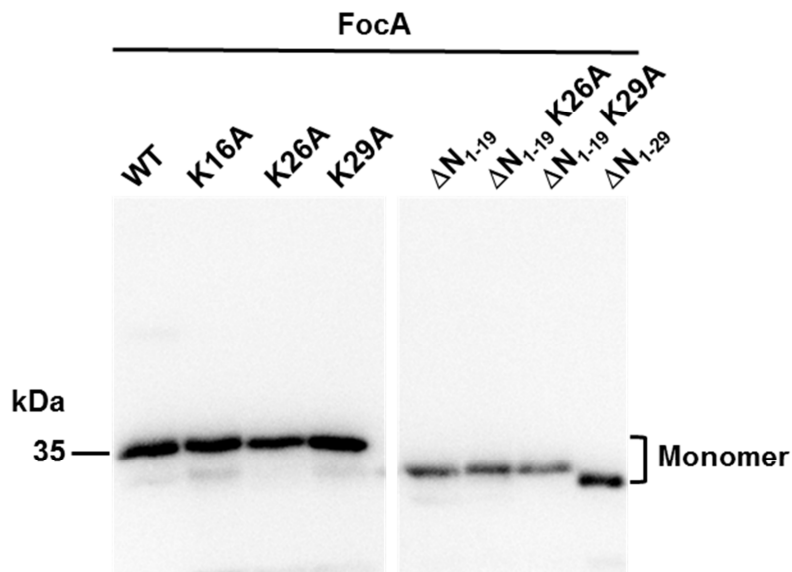


Abb. 4.42: Western Blot-Analyse der mikrosomalen Fraktion von FocA Wildtyp, Mutanten und N-terminal verkürzten Konstrukten, hergestellt in *S. cerevisiae*

Es wurde der α -Penta-His-Antikörper zur Analyse eingesetzt.

Die funktionellen Untersuchungen zeigten, dass die Beeinflussung des N-Terminus starke Auswirkungen auf den Transport und die pH-Abhängigkeit hat (Abb. 4.43). Keines der Konstrukte zeigte ähnliches Verhalten wie der Wildtyp. Während im neutralen pH-Bereich von 6,8 die Funktion gegenüber dem Wildtyp gleich oder leicht abgeschwächt war, wurde bei allen Konstrukten im sauren pH-Bereich keine bis nur geringe Erhöhung der Aufnahme gemessen. Interessanterweise kam dieser Effekt jeweils durch den Austausch eines der drei Lysine zum Tragen. Dies zeigt, dass die positive Ladung der im N-Terminus enthaltenen Lysine essentiell für die Funktion ist. Einzig das Lysin K26 ist unter den FNTs recht konserviert. Im N-Terminus von *PfFNT* sind 4 Lysine vorhanden: K16, K33, K34 und K35 (letzteres entspricht K26 in *FocA*). Die jeweiligen Punktmutationen zu einem Alanin wurden durchgeführt und die Herstellung in Hefen mittels Western Blot-Analyse bestätigt, jedoch wurden die Konstrukte im Rahmen dieser Arbeit nicht auf Funktionalität untersucht.

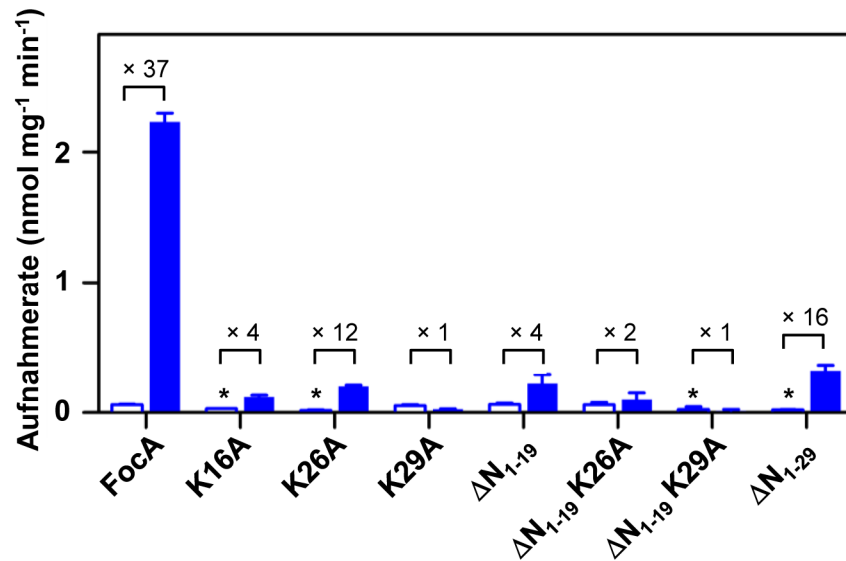


Abb. 4.43: Formiatleitfähigkeit via FocA Wildtyp, Mutanten und N-terminal verkürzten Konstrukten bei pH 6,8 (offene Balken) und 3,8 (geschlossene Balken)

Es wurde die ¹⁴C-Formiataufnahme (Gradient: 1 mM) bestimmt und die erhaltenen Messwerte auf 1 mg getrocknete Hefe normalisiert. Mit pDRTXa transformierte Hefezellen dienten als Negativkontrolle und wurden von den ermittelten Messwerten abgezogen. Die Fehlerbalken stellen S.E.M. dar und ergeben sich aus zwei bis drei biologischen Replikaten mit jeweils drei Messwerten. Bei funktionellen Transportern ist das Ratenverhältnis (pH 3,8 / pH 6,8) angegeben. Bei mit Sternen gekennzeichneten Konstrukten lag die Aufnahmerate bei pH 6,8 signifikant unterhalb des Wildtyps (t-Test, P < 0,05).

4.5 Dielektrische Verschiebung der Substratazidität

4.5.1 Verringerung der Substratazidität im hydrophoben FNT

FocA zeigte bei seiner Formiataufnahme ein pH-abhängiges Verhalten, welches eine glockenförmige Kurve mit einem Aufnahmemaximum im Bereich des Substrat- pK_S -Wertes aufwies. Wenn die Substrataufnahme ausschließlich von einem pK_S -Wert abhängen würde, zum Beispiel dem Substrat- pK_S in wässriger Lösung, würde sich gemäß der Hendersson-Hasselbalch-Gleichung eine sigmoidal verlaufende pH-Aufnahmekurve ergeben. Die zuvor erhaltenen glockenförmigen pH-Kurven der Formiataufnahme von FocA und der L-Laktataufnahme von PfFNT sprechen jedoch dafür, dass zwei pK_S -Werte für die pH-Abhängigkeit verantwortlich sind. Da das Protonierungsverhalten von Säuren und Basen abhängig vom Lösungsmittel ist, kann davon ausgegangen werden, dass das Substrat, wenn es innerhalb des Poreneingangs des Proteins ist, durch die lipophile Umgebung des Proteins eine pK_S -Verschiebung in Richtung eines neutralen Moleküls erfährt. Mit dieser Überlegung wäre zum einen die deprotonierte Form des Substrates im Lösungsmittel für die Annäherung an den Transporter entscheidend, und die protonierte Form des Substrates zur Überwindung der lipophilen Engstellen innerhalb des Transporters. Zur Berechnung der Anteile wurden zwei Hendersson-Hasselbalch-Gleichungen kombiniert (Gordon-Beresford et al, 1996):

$$\text{Rate} \propto \frac{c_1}{10^{pK_{S1}-pH} + 1} \times \left(c_2 - \frac{c_2}{10^{pK_{S2}-pH} + 1} \right)$$

Dabei ist pK_{S1} der pK_S -Wert des Substrates im wässrigen Puffer, pK_{S2} der pK_S -Wert des Substrates innerhalb des Proteins. c_1 und c_2 sind die entsprechenden Konzentrationen der Substrate. Diese sind jedoch für die Glockenkurvenform nicht entscheidend. Aus der Gleichung können durch Ermittlung der Wendepunkte pK_{S1} (aufsteigend) und pK_{S2} (absteigend) bestimmt werden. Da pK_{S1} bekannt ist (z.B. pK_{S1} (Formiat) = 3,8), sollte es durch Auswerten der ermittelten pH-Kurve möglich sein, die pK_S -Verschiebung des Substrates im Protein zu bestimmen. Durch das *fitting* der gemessenen Werte mit der oben genannten Formel konnte ein pK_{S2} -Wert von 4,3 für Formiat in FocA bestimmt werden (Abb. 4.44). Um dieses Verhalten auf Gesetzmäßigkeit zu überprüfen, wurde zusätzlich PfFNT sowie weitere Substrate untersucht und pH-Kurven aufgenommen. Als weitere Substrate wurden Acetat, Fluoracetat und L-Laktat gewählt. Acetat besitzt im wässrigen Puffer einen pK_{S1} -Wert von 4,8; das nicht physiologische Fluoracetat ist mit einem pK_{S1} von 2,6 eine wesentliche stärkere Säure bei gleichen dreidimensionalen Maßen. L-Laktat hat den gleichen pK_S -Wert wie Formiat, jedoch ein doppeltes Substratvolumen. Für diese vier Substrate wurden pH-abhängige Aufnahmekurven für

FocA und PflNT in einem pH-Bereich von 2,3-7,8 aufgenommen und das Aufnahmeverhalten analysiert (Abb. 4.44, Tab. 4.4). Interessanterweise zeigten sieben der acht untersuchten Bedingungen die Glockenkurvenform; ausschließlich bei der L-Laktataufnahme via FocA konnte kein Transport gemessen werden - dies wurde schon in Kapitel 4.1 untersucht und erläutert. Die Maximalraten der Substrate sanken mit erhöhtem Substratvolumen; auch dies ist auf die Substratselektivität über den Größenausschluss zurückzuführen, wie in Kap. 4.1 untersucht. Sehr interessant ist weiterhin, dass selbst Fluoracetat als starke Säure protoniert wurde und es zu einem pH-abhängigen Transportverhalten kommt. Obwohl es 100-fach azider gegenüber Acetat ist, zeigte es immer noch knapp 50 % von dessen maximaler Transportrate (Tab. 4.4).

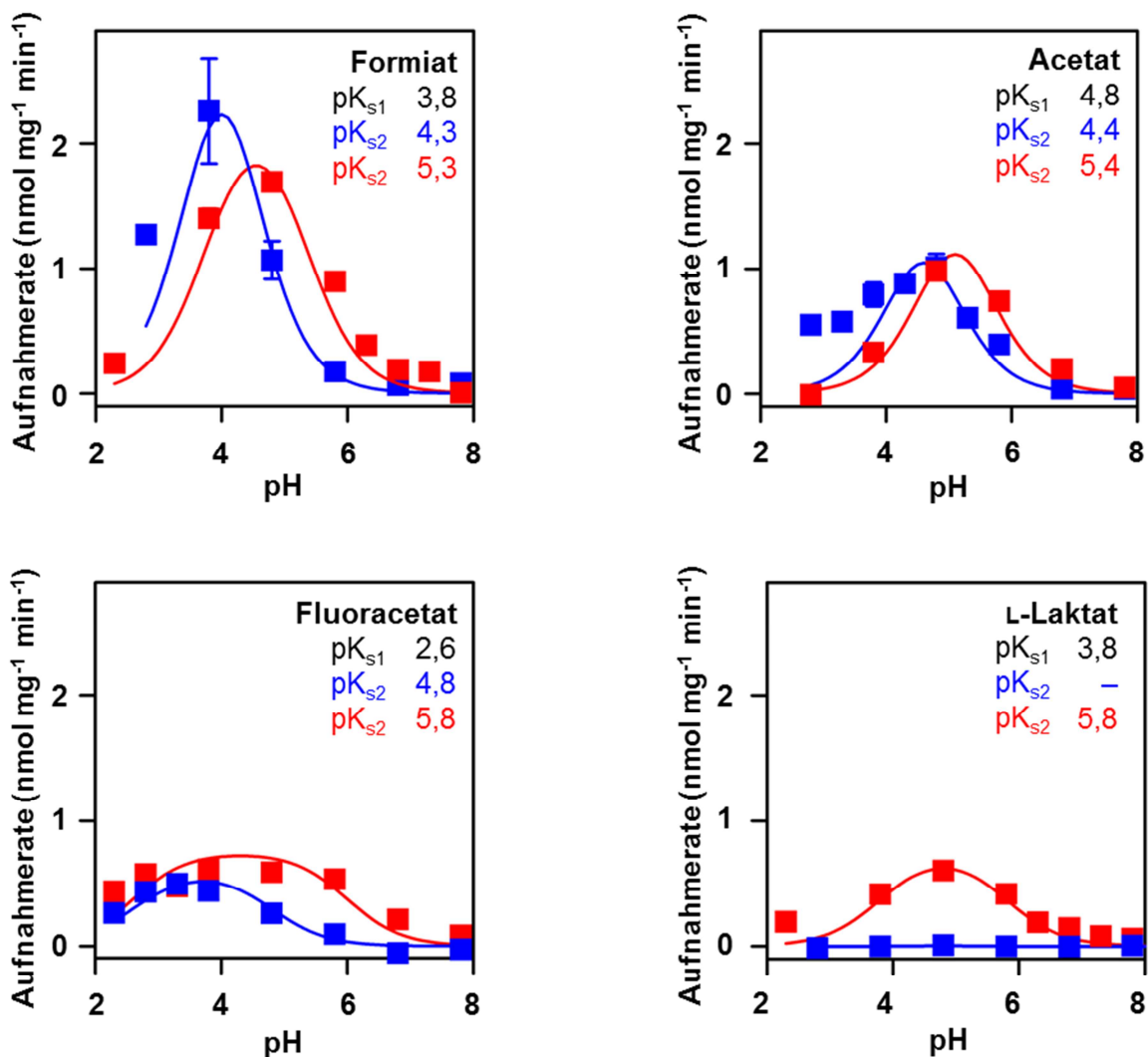


Abb. 4.44: pH-Profile verschiedener Substrate von FocA (blau) und PflNT (rot)

Aufnahmeraten wurden mit ^{14}C -markierten Substraten bei 1 mM Gradient und verschiedenen pH-Werten aufgenommen und die Raten auf 1 mg Hefe Trockengewicht normalisiert. Bei gleichen pH-Werten wurden mit pDRTXA transformierte Zellen ebenfalls vermessen und die erhaltenen Werte von denen des Transporters abgezogen. Es wurden Dreifachbestimmungen von drei biologischen Replikaten durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen S.E.M. dar.

Die ermittelten pK_{S2} -Werte für FocA unterschieden sich substratabhängig von 4,3 (Formiat) über 4,4 (Acetat) zu 4,8 (Fluoracetat). PfFNT zeigte eine Verschiebung zu höheren pK_{S2} -Werten: von 5,3 (Formiat) über 5,4 (Acetat) zu 5,8 (Fluoracetat, L-Laktat). Durch diese Verschiebung ergab sich, dass Transportraten von Substraten im neutralen pH-Bereich via PfFNT höher lagen als bei FocA; FocA benötigt also einen höheren Protonengradienten für die gleichen Transportraten.

Eine weitere Beobachtung waren steigende pK_{S2} -Werte mit steigenden Substratvolumen. Dies spricht dafür, dass größere Substrate einfacher protoniert werden, was den erschwerten, größenbedingten Transport kompensiert.

Die ermittelten pK_S -Werte, Transportraten und Substratvolumina sind in Tab. 4.4 zusammengefasst.

Tab. 4.4: Substratvolumina, pK_S -Werte und maximale Transportraten via FocA und PfFNT

	Substrat		FocA		PfFNT	
	Volumen (\AA^3)	pK_{S1}	Maximale Aufnahme- rate ($\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)	pK_{S2}	Maximale Aufnahme- rate ($\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)	pK_{S2}
Formiat	36,8	3,8	2,5	$4,3 \pm 0,2$	2,0	$5,3 \pm 0,2$
Acetat	53,5	4,8	1,1	$4,4 \pm 0,2$	1,7	$5,4 \pm 0,3$
Fluoracetat	58,5	2,6	0,5	$4,8 \pm 0,5$	0,7	$5,8 \pm 0,3$
L-Laktat	79,1	3,8	-	-	0,6	$5,8 \pm 0,4$

4.5.2 Bestimmung der Aktivierungsenergie

Die bisher gesammelten Daten deuten darauf hin, dass Substratanionen elektrostatisch vom Protein angezogen werden, es im Poreneingang zu einer Abschwächung der Substratazidität und somit zu einer vereinfachten Protonierung, also Neutralisation kommt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Protonierung um einen einfachen Protonierungsschritt handelt und nicht etwa um eine Protonierungskaskade (4.3.4). Sind die pK_S -Verschiebung sowie der einfache Protonierungsschritt des Substrates entscheidend für den Transportmechanismus, hat dies eine sehr geringe Aktivierungsenergie zur Folge. Mithilfe der in 4.5.1 bestimmten pK_S -Verschiebungen und folgender Formel konnten Aktivierungsenergien ΔG bestimmt werden (Sarmini & Kenndler, 1999):

$$\Delta G = 2,303 RT \Delta pK_S \quad (R = \text{Gaskonstante, } T = \text{absolute Temperatur in K})$$

Die maximale pK_S -Verschiebung lag bei FocA bei 1 und bei P*f*FNT bei 2. Mit der oben genannten Formel ergeben sich Aktivierungsenergien von 5,7-11,4 kJ mol⁻¹, dies entspricht 1,4-2,7 kcal mol⁻¹.

Indem Transportraten von Formiat im neutralen pH Bereich bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen wurden (10-30 °C), konnten in einem weiteren Experiment die jeweilige Aktivierungsenergie von FocA und P*f*FNT mithilfe der Arrhenius-Gleichung bestimmt werden (Arrhenius, 1889):

$$k = A e^{-E_a/RT} \quad (k = \text{Ratenkonstante} \quad A = \text{Faktor} \quad E_a = \text{Aktivierungsenergie} \\ R = \text{Gaskonstante} \quad T = \text{absolute Temperatur in K})$$

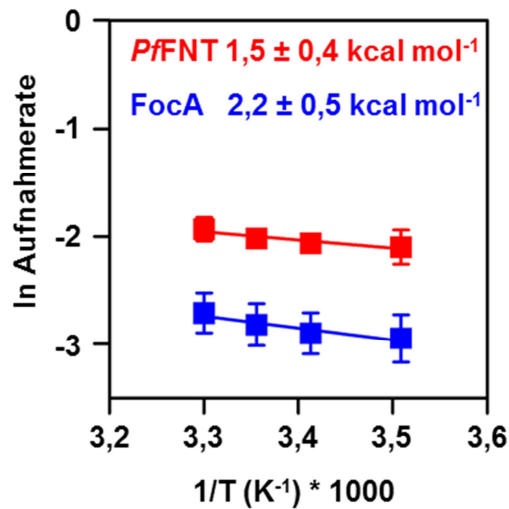


Abb. 4.45: Bestimmung der Aktivierungsenergie des Formiattransports via FocA und P*f*FNT

Aufnahmeraten wurden bei verschiedenen Temperaturen mit ¹⁴C-markierten Substraten (1 mM Gradient, pH 6,8) aufgenommen und die Raten auf 1 mg Hefe Trockengewicht normalisiert. Nicht-exprimierende Zellen wurden ebenfalls vermessen und die erhaltenen Werte von denen des Transporters abgezogen. Die Aktivierungsenergien wurden aus der Steigung der linearisierten Arrheniusgleichung ermittelt. Es wurden Dreifachbestimmungen von drei biologischen Replikaten durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen S.E.M. dar.

Um über die experimentellen Daten die Aktivierungsenergie zu bestimmen, wurde die Arrheniusgleichung linearisiert:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R * T}$$

Bei diesem Experiment wurden Aktivierungsenergien von $2,2 \pm 0,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ für FocA und $1,5 \pm 0,4 \text{ kcal mol}^{-1}$ für P β FNT bestimmt (Abb. 4.45). Diese Werte liegen beide im Bereich der berechneten Aktivierungsenergien, welche sich aus den pH-Kurven ergeben haben. Diese sehr niedrigen Werte der Aktivierungsenergie liegen im Bereich einer einzelnen Wasserstoffbrückenbindung ($< 4 \text{ kcal mol}^{-1}$) (Fersht et al, 1985). Dies unterstreicht die Vermutung, dass ein einzelner Protonierungsschritt den Transport der Substratanionen via FNTs ermöglicht.

4.5.3 Rolle von K156 an der Protonierung

Die verbleibende Frage war nun, woher das Proton kommt, welches das Substratanion neutralisiert. Als Protonendonator kamen zum einen das zentrale konservierte Histidin (H209 in FocA), das im Poreneingang liegende konservierte Lysin (K156 in FocA) oder aber Bulkwasser des Extrazellulärraums in Frage.

Da für die Aufgabe des Protonentransfers in der Literatur oft das zentrale Histidin genannt wurde, wurden die im Protein vorherrschenden pK_S -Werte mithilfe des DEPTH-Servers berechnet (3.5.3). Aufgrund der Abschirmung vom Lösungsmittel resultierte für das Histidin ein pK_S -Wert von < 2 . Dies deutet darauf hin, dass das Histidin ungeladen vorliegt und somit ebenfalls nicht die Aufgabe der Protonierung übernehmen kann.

Um die mögliche Beteiligung des Lysins zu untersuchen, wurden pK_S -Werte dieser Aminosäure innerhalb des Proteins ebenfalls mittels DEPTH berechnet. Lysin hat in wässriger Umgebung einen pK_S von 10,5 – innerhalb des Proteins wurden verringerte pK_S -Werte von $9,0 \pm 0,1$ für K156 in FocA und $7,6 \pm 0,3$ für K177 in P β FNT berechnet (Abb. 4.46). Damit das Lysin, eine starke Base, als Protonendonator dienen kann, bräuchte es eine dramatische Veränderung des pK_S -Wertes um 5-6 log-Einheiten, um den pK_S -Wert des Formiat zu treffen. Zwar nähern sich beide pK_S -Werte einander an (Abb. 4.46), jedoch liegen zwischen Formiat und dem Lysin immer noch 2 - 4 pK_S -Einheiten, die das Lysin somit als Protonendonator ausschließen.

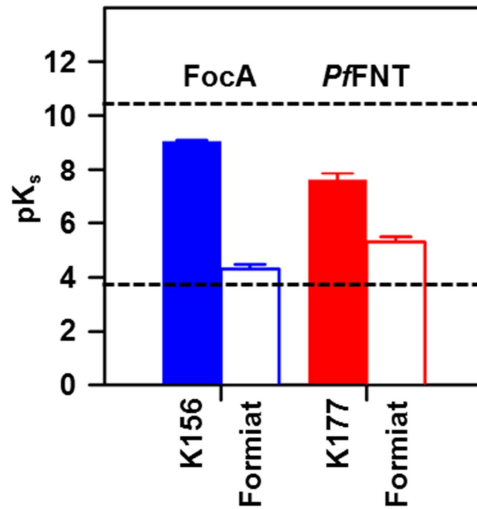


Abb. 4.46: pK_s-Verschiebung von Formiat und dem K156/K177 in FocA (blau) /PfFNT (rot)

Die pK_s-Werte von Formiat wurden den Ergebnissen aus 4.5.1 entnommen. Die benutzten Proteinstrukturen sind PDB # 3Q7K (FocA) und ein PfFNT Modell basierend auf der PDB-Struktur # 3Q7K. Die pK_s-Werte der Lysine wurden für jedes Monomer der Pentamerstruktur berechnet und daraus den S.E.M. ermittelt.

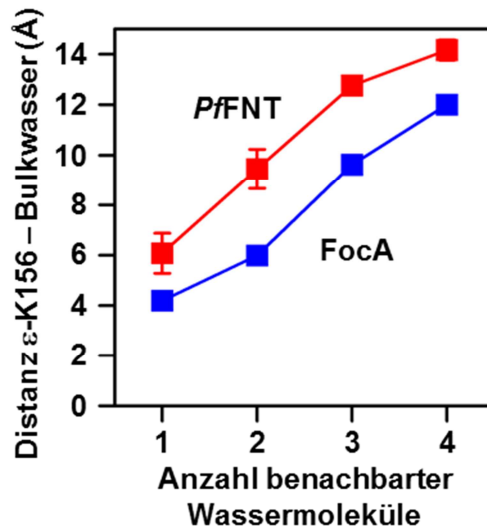


Abb. 4.47: Berechnung der residue depth zum Bulkwasser von FocA (blau) und PfFNT (rot)

Berechnet wurde die Distanz des ε-Stickstoff des Lysins (FocA K156, PfFNT K177) zum Wasser-Cluster des Bulklösungsmittels. Die Anzahl benachbarter Wassermoleküle gibt an, wie viele Wassermoleküle sich in Brückenbindungsnähe zu dem Wassermolekül befinden, welches die geringste Distanz zum ε-Stickstoff des Lysins besitzt. Die Berechnung wurde für jedes Monomer des FNT-Pentamers durchgeführt und daraus die S.E.M. bestimmt.

Die *residue depth* Berechnungen des DEPTH-Servers zeigten auch, dass die Distanz des Lysins zum Bulkwasser wesentlich größer als eine Wasserstoffbrückenbindung von etwa 2,5 Å (Hibbert & Emsley, 1990) ist. Für FocA wurde eine minimale Distanz vom ϵ -Stickstoff der Lysinseitenkette zum Bulkwasser von 4,1 Å gemessen, beim PfFNT waren es sogar 6,1 Å (Abb. 4.47). PfFNT ist somit besser vom Bulkwasser abgeschirmt als FocA, was erklärt, warum PfFNT in vorherigen Experimenten einen niedrigeren Protonengradienten benötigte als FocA.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden weiterhin Solvatationsmodelle von FocA (PDB # 3Q7K) mit einem Formiatanion sowie der protonierten Form Ameisensäure durchgeführt, welche benachbart zum Lysin im Poreneingang liegen, und die kleinste Distanz zwischen Bulkwasser und Substratmolekül gemessen (Abb. 4.48). In beiden Fällen war die Distanz größer als 3 Å, was eine Isolation des Substrates vom Bulkwasser bedeutet, wenn dieses das Lysin erreicht. Darauf schlussfolgernd könnte das Substrat-neutralisierende Proton vom Bulkwasser zur Verfügung gestellt werden. Es wird möglicherweise an einem bestimmten Punkt übertragen, wenn sich das Substratanion in der Nähe des Lysins im lipophilen Poreneingang befindet und die Substratazidität durch die dielektrische Umgebung herabgesetzt ist.

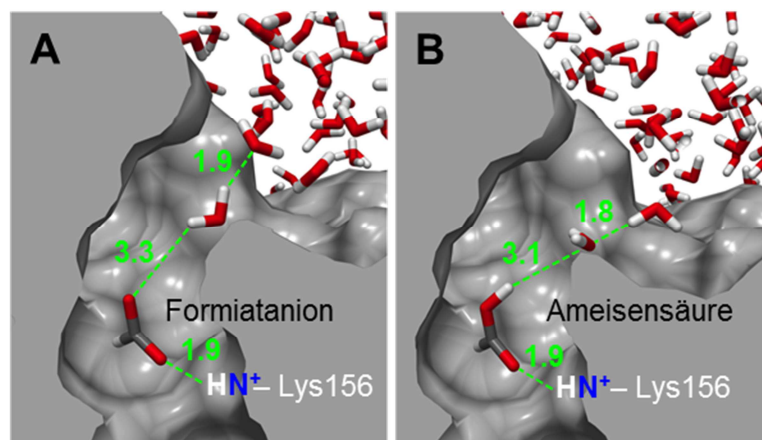


Abb. 4.48: Solvatationssimulation von FocA (PDB # 3Q7K) mit einem Formiatanion (A) und neutraler Ameisensäure (B)

Die Solvatationsmodelle wurden mit Chimera[®] erstellt.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die strukturelle Grundlage der unterschiedlichen Substratspektren von eukaryotischen und prokaryotischen FNTs zu erfassen sowie die Frage zu beantworten, ob und wie Substratanionen protoniert werden, um die lipophilen Engstellen des FNT-Transportpfades passieren zu können. Dazu wurden Mutationsanalysen der FNTs FocA und P_FFNT durchgeführt sowie verschiedene Versuchsbedingungen gewählt, um die einzelnen Fragestellungen beantworten zu können. Für einen Großteil der Experimente diente *S. cerevisiae* als Testsystem.

5.1 Evaluierung des *S. cerevisiae*-Testsystems

S. cerevisiae wurde in dieser Arbeit als hauptsächliches biologisches Testsystem verwendet, da die Zellen pH-Bereichen von 2,3 bis 7,8 und Temperaturbereichen von 4 °C bis 30 °C ausgesetzt waren und in diesen Bereichen beständig sein mussten. Für die Untersuchungen wurde eine *S. cerevisiae*-Zelllinie verwendet, welche *Gen-knockouts* des endogenen Laktattransporters *Jen1* sowie des Acetattransporters *Ady2* besitzt (Cassio et al, 1987; Casal et al, 1999; Paiva et al, 2004).

Der Pilz *S. cerevisiae*, besser bekannt als die Bäckerhefe, ist ein kleiner einzellulärer Organismus, der in weiten pH-Bereichen, Osmolalitäten und verschiedensten Ionenzusammensetzungen im Medium bestehen kann (Volkov, 2015). Er gehört zu den best untersuchten eukaryotischen Organismen mit einem kleinen, haploiden sequenzierten Genom sowie einer großen Auswahl von Mutanten in spezifischen Genen und ist leicht genetisch und molekularbiologisch zu manipulieren.

Jen1 gehört zur *major facilitator*-Familie (TC 2.A.1.12.2), *Ady2* gehört zu den Acetat-Aufnahmetransportern (TC 2.A.96.1.4). Beide sind sekundär aktive Transporter, die über einen Protonensymport die ungeladene Substratform transportieren (Casal et al, 2016). Trotz der *knockouts* wurden in Aufnahmeassays mit *S. cerevisiae* vor allem im sauren pH-Bereich Substrataufnahmen gemessen (Abb. 5.1). Es handelt sich hierbei um die einfache Diffusion der ungeladenen Substratmoleküle über die Membran – der im sauren pH-Bereich erhöhte Anteil an ungeladener Spezies erklärt die erhöhten Aufnahmeraten. Weiterhin kann über das Aquaglyceroporin *fps1* undissoziierte Essigsäure erleichtert diffundieren (Mollapour & Piper, 2007). Dies könnte erklären, warum vor allem Acetat/Essigsäure die größte Membrandiffusion aufweist, da die verwendete Zelllinie keinen *fps1 knockout* besitzt. Ein weiterer Grund dafür ist, dass Acetat einen

pK_S -Wert von 4,8 besitzt, während Formiat und L-Laktat einen pK_S -Wert von 3,8 aufweisen; Acetat liegt somit bei gleichem äußeren pH zehnmal mehr in der undissoziierten Form vor. Über die niedrige Membrandiffusion von L-Laktat durch Hefezellen ist bereits berichtet worden (Cassio et al, 1987).

Auch in weiteren Systemen wie Liposomen (Holm-Bertelsen et al, 2016), Oozyten (Marchetti et al, 2015) und *E. coli* (4.3.7) wurden Membrandiffusionen schwacher, monovalenter Säuren beobachtet.

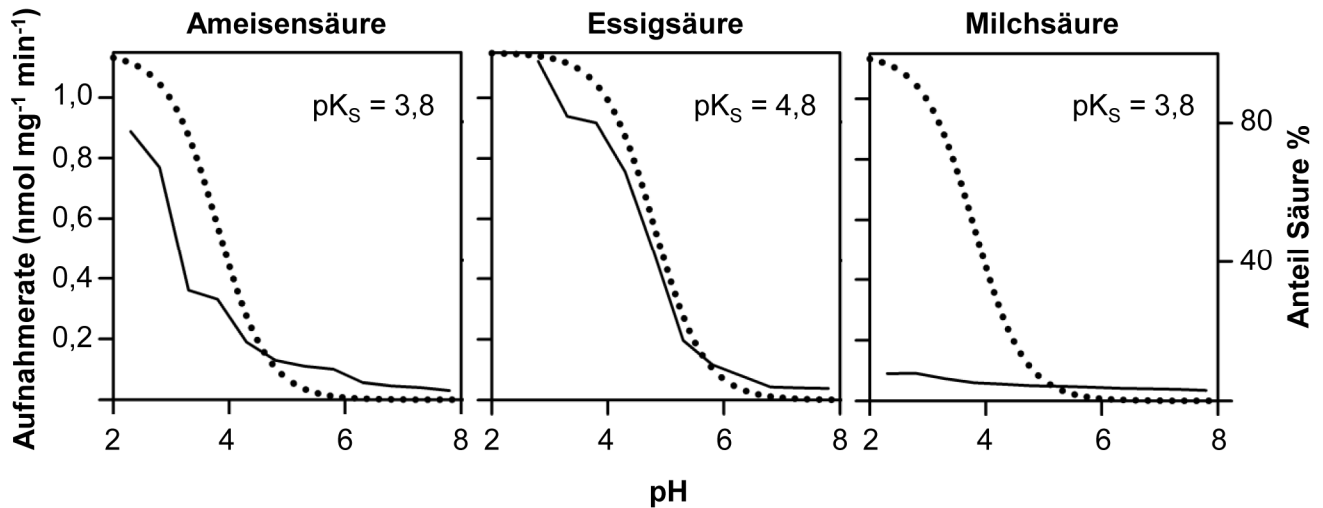


Abb. 5.1 Membrandiffusionen gemessener Substrate durch *S. cerevisiae*

Es sind die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Aufnahmeraten von Ameisensäure, Essigsäure und Milchsäure durch die Hefemembran bei 1 mM Substratgradient dargestellt. Die gepunkteten Kurven geben den prozentualen Anteil undissoziierter Säure an.

Die erfolgreiche Herstellung aller untersuchten FNTs und Mutanten hat sich als ein Vorteil von *S. cerevisiae* gezeigt (4.1, 4.2, 4.4). Die Herstellung von PfFNT in *E. coli* hingegen führte zu *inclusion bodies* des Proteins (Dissertation Dr. Julia Holm-Bertelsen).

Außerdem sind die Oberflächen-Volumen-Verhältnisse bei *S. cerevisiae* günstiger für die praktische Durchführung des Aufnahmeassays mit radioaktiv markierten Substraten gegenüber anderen Testsystemen. Ein größeres Oberflächen-Volumen-Verhältnis resultiert in einer schnelleren Aufnahme, aber auch einer schnelleren Sättigung. Gehen wir bei *S. cerevisiae* von einem durchschnittlichen Durchmesser der Zelle von 5 μm und einem kugelförmigen Körper aus, entspricht dies einem Zellvolumen von 65 fl (Klis et al, 2014). Im Vergleich: Zellen aus dem kleineren prokaryotischen *E. coli*-Organismus haben ein durchschnittliches Volumen von 3 fl (Volkmer & Heinemann, 2011), Erythrozyten besitzen ein Zellvolumen von 100 fl (Jay, 1975), das Volumen von *Plasmodium falciparum* im Trophozoitenstadium ist 20 fl (Ginsburg, 2002). Die sich daraus

ergebenden Oberflächen-Volumen-Verhältnisse sind in Tab. 5.1 zusammengefasst. Aufgrund des optimalen Oberflächen-Volumen-Verhältnisses von *S. cerevisiae* war die praktische Bestimmung der initialen Aufnahmeraten bei gegebenen Assaybedingungen handwerklich gut umzusetzen.

Tab. 5.1 Dimensionen verschiedener Testsysteme

V= Volumen, OF = Oberfläche

Testsystem	V in m ³	OF in m ²	OF/V in m ⁻¹
<i>E. coli</i>	3×10^{-18}	1×10^{-11}	$3,3 \times 10^7$
<i>P. falciparum</i> (Trophozoit)	2×10^{-17}	$3,6 \times 10^{-11}$	$1,8 \times 10^6$
<i>S. cerevisiae</i>	$6,5 \times 10^{-17}$	$7,8 \times 10^{-11}$	$1,2 \times 10^6$
Oozyt aus <i>Xenopus laevis</i>	9×10^{-10}	$4,5 \times 10^{-6}$	5×10^4

Es stellt sich die Frage, ob die mit dem *S. cerevisiae*-Testsystem erhaltenen Aufnahmeraten mit Aufnahmeraten in anderen Testsystemen vergleichbar sind. Dafür muss zunächst abgeschätzt werden, wieviele FNT-Transporter sich auf der Oberfläche der jeweiligen Zellen befinden. Das am meisten vorhandene Membranprotein der *S. cerevisiae*-Plasmamembran ist die Protonenpumpe Pma1, eine Protonen-ATPase, welche Protonen aus dem Zytoplasma pumpt und somit das Membranpotential zu negativeren Werten schiebt (Serrano et al, 1986). Es stellt etwa 15-20 % aller Membranproteine in der Hefezelle dar (Eraso et al, 1987). Durch Expressionsanalysen konnte abgeschätzt werden, dass sich etwa 125.000 Pma1-Moleküle auf einer Plasmamembran befinden (Permyakov et al, 2012; Volkov, 2015). Für Ionenkanäle und Transporter wurden Werte von etwa 2000 Molekülen pro Plasmamembran ermittelt, einige Membranproteine kommen aber auch nur wenige Male pro Zelle vor (Ghaemmaghami et al, 2003). Der mögliche Bereich der FNT-Anzahl ist groß, was es schwierig macht, mit den ermittelten Daten Aufnahmeraten pro FNT-Transporter abzuwägen. Für eine detailliertere Analyse wäre es möglich, ein Referenzprotein wie etwa Pma1 als internen Marker zu benutzen; mithilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern könnte dadurch

halbquantitativ die Anzahl an heterolog hergestellten FNTs in der Hefezelle abgeschätzt werden. Dazu könnten beispielsweise durchflusszytometrische Methoden verwendet werden.

Derzeit kann die Anzahl der in der Hefemembran enthaltenen FNTs also nur abgeschätzt werden. Für PfFNT wurde in dieser Arbeit im neutralen pH-Bereich eine Aufnahme rate von $0,086 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ für L-Laktat in *S. cerevisiae* bestimmt (4.1.2), in Oozyten wurden Raten von etwa $9 \text{ pmol min}^{-1} \text{ Oozyte}^{-1}$ gemessen (Marchetti et al, 2015) und der Parasit selbst schleust $18 \text{ mmol l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ L-Laktat aus (Pfaller et al, 1982). Um die Werte miteinander zu vergleichen, muss zunächst die Aufnahme rate in Hefen auf die Aufnahme pro Zelle abgeschätzt werden. Da das mittlere Gewicht einer Hefezelle 50 pg beträgt, kann davon ausgegangen werden, dass pro mg getesteter Hefemasse etwa 2×10^7 Zellen vorhanden sind (Klis et al, 2014). Geht man von vermuteten 1000 Transportern pro Zelle aus, entspricht dies einer Aufnahme rate von 43 Laktatmolekülen pro Sekunde und Transporter (Tab. 5.2). In Oozyten wurde für die Expression des Natrium/Glucose-Cotransporters SGLT1 10^{10} - 10^{11} Transporter pro Oozyte ermittelt (Longpre & Lapointe, 2011). Nimmt man 10^{10} FNTs pro Oozyte an, ergibt sich eine Aufnahme rate von 9 Laktatmolekülen pro Sekunde und Transporter. Innerhalb des Fehlerbereiches und unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Oberflächen-Volumen-Verhältnisse sind diese Transportraten also vergleichbar. Da für *Plasmodium* Parasiten derzeit keine quantitativen Daten über die Menge von Membranproteinen auf der Plasmamembran vorliegen, ist hier nur die Rate pro Parasiten-Zelle möglich. Unter Berücksichtigung der unbekannteren Transporterzahl und des unbekannteren Substratgradienten ist die Möglichkeit, diese Rate ebenfalls im Bereich der anderen Systeme einordnen zu können, nicht auszuschließen.

Für FocA wurden mittels *single channel recordings* die Affinitätskonstante und die maximale Leitfähigkeit bestimmt (Lü et al, 2012a). In elektrophysiologischen Experimenten wird die Transportrate als Leitfähigkeit in Siemens ausgedrückt. Mithilfe des Ohm'schen Gesetzes kann daraus die Stromdichte berechnet werden:

$$I = G \times U \quad \text{bzw.} \quad i = \gamma \times U \quad (\text{für } \textit{single channel recordings})$$

Bezieht man die Stromdichte auf die Molekülanzahl (Avogadrokonstante N_A) und die Kapazität (Faraday-Konstante F), kann die Rate berechnet werden:

$$\text{Rate} = \frac{I \times N_A}{F}$$

Elektrophysiologische Messungen haben bei *single channel recordings* ($U = 150 \text{ mV}$) eine maximale Laktatleitfähigkeit von 27 pS für FocA ergeben, was einer maximalen Transportrate von $2,5 \times 10^7$ Substratmoleküle s^{-1} entspricht. Dies liegt deutlich über den berechneten Transportraten in Hefen und Oozyten. Für die Messung der Nitritleitfähigkeit via NirC wurden *solid supported*

membrane-basierte Elektrophysiologiemessungen durchgeführt, die eine Umsatzrate von 10-100 s⁻¹ ergaben (Rycovska et al, 2012; Rycovska-Blume et al, 2015), was wiederum eher den in biologischen Systemen erhaltenen Raten entspricht. Die berechneten Transportraten sind in Tab. 5.2 zusammengefasst.

Tab. 5.2 Berechnete Transportraten der FNTs in verschiedenen biologischen Systemen

Testsystem	Aufnahmerate L-Laktat	Anzahl Transporter	Rate in Moleküle s ⁻¹
<i>S. cerevisiae</i>	0,086 nmol mg ⁻¹ min ⁻¹ (1 mM Gradient)	ca. 1000?	43 s ⁻¹
<i>P. falciparum</i> (Trophozoit)	18 mmol l ⁻¹ min ⁻¹	?	3,6 × 10 ⁶ Parasit ⁻¹ s ⁻¹
Oozyt aus <i>Xenopus laevis</i>	9 pmol Oozyte ⁻¹ min ⁻¹ (1 mM Gradient)	1 × 10 ¹⁰	9 s ⁻¹
<i>single channel recordings</i>	27 pS (150 mM Gradient)	1	2,5 × 10 ⁷ s ⁻¹

Die Spanne möglicher Transportraten ist somit groß, es zeichnet sich jedoch ab, dass FNTs im Vergleich zu Kanälen wie etwa AQPs niedrigere Transportraten aufweisen (Agre et al, 2002). Genauere Aussagen zur Transportrate ließen sich mittels verbesserter Proteinquantifizierung oder molekuldynamischen Studien treffen.

5.2 Selektivität der FNTs

5.2.1 Substratselektivität

FNTs weisen eine große Bandbreite an Substraten auf, die sich sowohl in Größe als auch in Azidität stark unterscheiden (Abb. 5.2). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob das weite Substratspektrum bereits untersuchter FNTs auf eukaryotische FNTs übertragbar ist, oder ob sich einzelne Vertreter in ihrer Selektivität unterscheiden (4.1). Fluoracetat konnte in dieser Arbeit als erstes unnatürliches Substrat für *FocA* und *PfFNT* gefunden werden, während die zuvor publizierte Laktatleitfähigkeit von *FocA* widerlegt wurde.

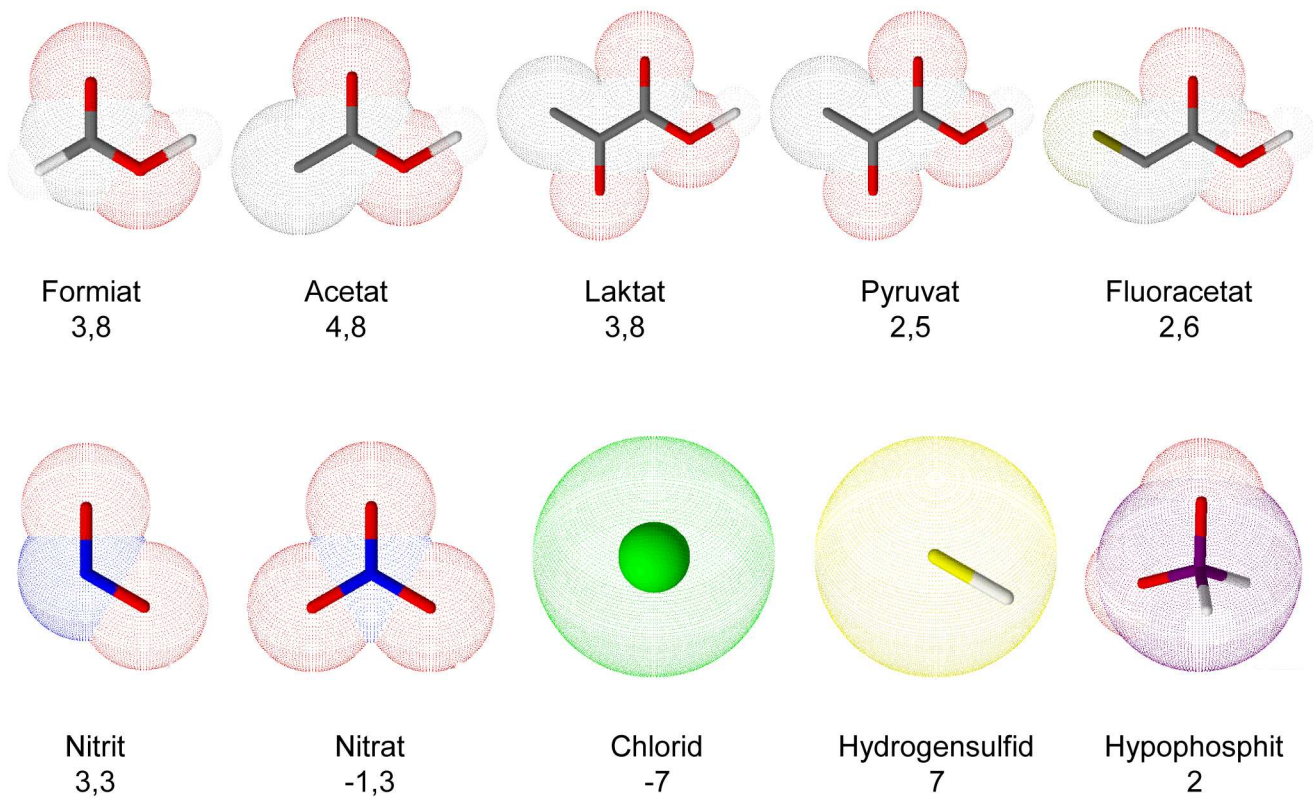


Abb. 5.2 Substrate der FNTs sowie deren pK_s -Werte

Strukturformeln der Substrate sind mit van-der Waals-Radien gezeichnet; erstellt mit ChemSketch[®].

Biologische Membranen sind für geladene Moleküle praktisch nicht durchlässig, sodass die Verschiebung von Ionen die Aktion von bestimmten membranständigen Transportern oder Kanälen erfordert (Singer & Nicolson, 1972; Singer, 1990). Membranproteine haben somit die bedeutende Aufgabe, einen hohen Grad der Selektivität aufzuweisen, um andere Ionengradienten unbeeinflusst zu lassen, und gleichzeitig hohe Transportraten zu garantieren. Handelt es sich um eine Verschiebung von Ladungen über die Membran, wird dieser Transport als elektrogen bezeichnet.

Kationenkanäle sind hoch selektiv, schließlich ist der Transmembrangradient des Kations H^+ essentiell für die Existenzfähigkeit jeder lebenden Zelle. Auch die Gradienten von Na^+ , K^+ oder Ca^+ werden für zentrale Signalprozesse in Lebewesen benötigt. Anionen hingegen werden meist über Membranen transportiert, um Ladungen auszugleichen (vor allem Chlorid) oder aber sie dienen als metabolische Substrate in assimilatorischen und dissimilatorischen Stoffwechseln, daher ist hier die Ionenselektivität weniger streng.

Bestimmte Substrate wie Chlorid können zwar an FNTs binden, diese aber nicht passieren. Um ein Blockieren zu verhindern, müssen diese rasch vom Poreneingang entfernt werden. Daher scheint es physiologisch sinnvoll, dass FNTs eine schwache Substrataffinität aufweisen, welche im millimolaren Bereich liegt (Lü et al, 2012a; Wu et al, 2015, 4.3.5). Die Wahrscheinlichkeit des Transports von nicht-physiologischen Substraten oder Substraten mit kleiner Transportwahrscheinlichkeit (z.B. nicht-protonierbare Chloridionen) wird dadurch gering gehalten und somit der Transportweg weitestgehend frei gehalten.

Es wurden mehrere Vertreter der FNTs strukturell und experimentell verglichen, um ein valides Modell der Substratselektivität aufzustellen. Dazu wurden die Substratprofile von zwei prokaryotischen Vertretern, FocA und NirC mit Substratprofilen der eukaryotischen Vertreter PfFNT und BbFNT verglichen. Als Substrate wurden die drei wichtigsten physiologischen Substrate Formiat, Acetat und L-Laktat gewählt (4.1). Dabei fiel auf, dass prokaryotische FNTs selektiv kleine Moleküle wie Formiat und Acetat leiten, während eukaryotische FNTs auch größere und voluminöse Substrate wie L-Laktat leiten. Die Selektivität der unterschiedlich großen physiologischen Substrate Formiat, Acetat und L-Laktat korrelieren im PfFNT direkt mit der Fläche des Transportpfades, welche sich über der extrazellulären Engstelle befindet.

Es ist zu klären, ob das Propionat als Homolog des Acetats von prokaryotischen FNTs transportiert wird, da L-Laktat von diesen ausgeschlossen wird. Diese Beobachtung könnte den sterischen Einfluss der Hydroxylgruppe des Laktats beurteilen.

Durch Mutationen im FocA sollte der Selektivitätsfilter eukaryotischer FNTs nachgeahmt werden, um gegebenenfalls eine L-Laktatleitfähigkeit zu generieren. Es konnte zwar gezeigt werden, dass die Selektivität für Acetat trotz seiner zusätzlichen Methylgruppe gegenüber Formiat gestiegen ist,

trotzdem konnte durch Erweitern dieses Filters L-Laktat nicht den Substratpfad passieren. Die ähnliche Transportrate von Formiat und Acetat erklärt sich, wenn die Dimensionen der Moleküle betrachtet werden. Der Projektionsdurchmesser beider Moleküle ist nahezu gleich (5,28 Å gegen 5,30 Å), wenn sie mit der Carboxylgruppe nach unten zur Konstriktion hin gerichtet sind. Außerdem liegt Acetat aufgrund seiner Dissoziationskonstante von 4,8 gegenüber Formiat zehnfach höher in seiner undissoziierten Form vor. NirC zeigt eine Selektivität für Formiat, welches genauso groß ist wie das natürliche Substrat Nitrit, Acetat hingegen wird ausgeschlossen. Dies kann dadurch erklärt werden, dass an Position 198 im NirC ein voluminöses Isoleucin liegt, während FocA an der entsprechenden Position 203 ein Valin besitzt, wodurch die Form der Pore an dieser Stelle in NirC verengt wird (Abb. 4.9). Formiat, jedoch nicht Acetat, kann den Filter durch eine Rotation, mit der Carboxylgruppe an der Seite, passieren (4,48 Å, Abb. 4.15). Bedingt durch die zusätzliche Methyl- und Hydroxylgruppe ist L-Laktat im Vergleich zu Acetat wesentlich voluminöser (6,00 x 7,06 Å). Die Substratformen und Dimensionen können zusammen mit dem Größenausschluss des Selektivitätsfilters die gemessenen Transportprofile erklären. Die lipophilen Konstriktionen, welche sowohl in eukaryotischen als auch prokaryotischen FNTs hoch konserviert vorliegen, sind nicht an der Substratselektivität beteiligt, obwohl sie die engsten Stellen des Transportpfades darstellen (4.1.4). Dies stimmt mit vorherigen experimentellen, elektrophysiologischen Daten überein: *single channel* Aufnahmen von FocA zeigen schnelle Öffnungs- und Verschlussereignisse innerhalb einer milli-Sekunden-Skala, was auf Bewegungen der lipophilen Seitenketten schließen lässt (Lü et al, 2012a). Die flexiblen Seitenketten können so neutrale Substrate passieren lassen und zeigen damit ihre Funktion als energetische Barriere gegen die Passage geladener Teilchen (Lv et al, 2013).

Die Frage ist nun, welcher weitere Aspekt für die Substratselektivität verantwortlich ist, schließlich konnte durch Erweiterung des Selektivitätsfilters von FocA keine Laktatleitfähigkeit generiert werden. Interessanterweise zeigte der Austausch von Tyrosin 52 in FocA zum kleineren Serin eine stark verminderte Acetatleitfähigkeit gegenüber Formiat (Abb. 4.14, Tab. 4.3), obwohl das Tyrosin nach oben gerichtet ist und sich somit nicht auf der Selektivitätsfilterebene befindet. Dies lässt vermuten, dass der Austausch der aromatischen Aminosäure zu strukturellen Verschiebungen des Transporters führt, welcher die Zugänglichkeit des Acetats beeinträchtigt. Es zeigt auch, dass nicht nur die zweidimensionale Fläche des Filters entscheidend ist, sondern die dreidimensionale Form des Poreneingangs betrachtet werden sollte. Stellt man die Porenprofile verschiedener FNTs mittels HOLE[®] (Smart et al, 1996) dar, ist ein deutlicher Unterschied in der Form des Poreneingangs zu erkennen (Abb. 5.3). Prokaryotische FNTs zeigen einen schmalen und engeren Poreneingang als eukaryotische Vertreter. Es ist somit einen Versuch wert, den Poreneingang oberhalb der gewählten Selektivitätsfilterebene durch Mutationen zu erweitern, um eine Laktatleitfähigkeit bei prokaryotischen

FNTs zu generieren. Die Beobachtung der unterschiedlichen Poreneingangsformen kann in Zukunft manifestiert werden, sobald Kristallstrukturen von eukaryotischen FNTs vorliegen.

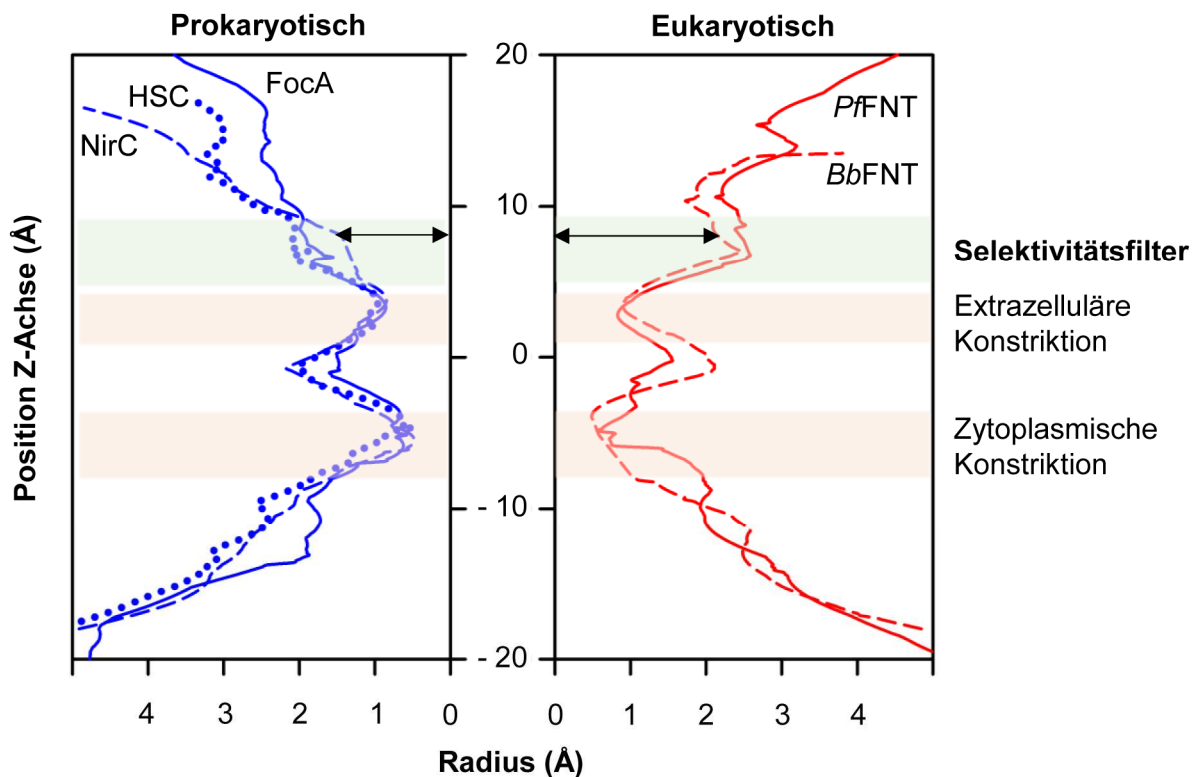


Abb. 5.3: Vergleich der Transporterprofile prokaryotischer und eukaryotischer FNTs

Es wurde der durchschnittliche Radius der Transportpfade mit HOLE[®] (Smart et al, 1996) berechnet für FocA (PDB # 3KCU), NirC (4FC4), HSC (3TDO) sowie mit Swissmodel[®] erstellten Modellen von PfFNT und BbFNT, basierend auf PDB # 3KCU. Der Radius innerhalb des Selektivitätsfilters ist mit Pfeilen gekennzeichnet.

Sowohl die experimentellen als auch bioinformatischen Untersuchungen sprechen dafür, dass die Substratselektivität eukaryotischer FNTs dahingehend angepasst wurde, dass sie den metabolischen Anforderungen einer eukaryotischen Zelle entspricht. Die Daten haben gezeigt, dass in eukaryotischen FNTs innerhalb des hydrophobischen Lysin Filters (Φ/K) kleine Aminosäuren sowie ein trichterförmiger Poreneingang auftreten, um besser große Substrate - vor allem L-Laktat als Hauptprodukt der Energiegewinnung - transportieren zu können.

Trotz alledem muss die Frage beantwortet werden, warum sich ein Größenausschlussfilter nur auf einer Seite des Transportpfades befindet. Im ersten Moment könnte dies für eine bevorzugte physiologische Richtung sprechen oder sogar eine Transportblockade bedeuten, falls ein zu großes Substrat von der nicht-physiologischen Seite eintritt. Es scheint vor allem dann kritisch, wenn in

dieser und anderen Arbeiten die Importrichtung von *PfFNT* untersucht wurde, obwohl für den Malariaparasiten der Export von Milchsäure physiologisch relevant ist (Wu et al, 2015; Marchetti et al, 2015). Jedoch wurde bereits für AQPs gezeigt, dass die Passage von Substraten wie Wasser, Glycerol, Harnstoff etc. immer bidirektional abläuft (Hub & Groot, 2008; Savage et al, 2010). Um in beide Richtungen zu funktionieren und Substrate, welche den Kanal nicht passieren können, an einer Blockade zu hindern, müssen diese schnell freigesetzt werden. Energieberechnungen der AQP-Kanäle zeigten, dass aufgrund der niedrigen Affinität zum Protein die Position der substratselektiven Konstriktion unerheblich für den bidirektionalen Transport ist (Hub & Groot, 2008; Savage et al, 2010). Auch bei den AQPs befindet sich der Größenselektivitätsfilter asymmetrisch auf der extrazellulären Seite. Die Lage des Selektivitätsfilters ist somit unerheblich für die Richtung der Substratpassage in FNTs.

5.2.2 Ladungsselektivität

Die Lage des Selektivitätsfilters, welcher sich auf der extrazellulären Seite befindet, die Zusammensetzung der Aminosäuren, sowie das Prinzip des Größenausschlusses erinnern stark an die aromatische Arginin-Region der AQPs (Beitz et al, 2006). Doch welche weiteren Filter befinden sich in den FNTs? Die lipophilen Konstriktionen dienen zur Abschirmung von Wasser und geladenen Teilchen. Untersuchungen in dieser Arbeit der Position F94 in *PfFNT* haben gezeigt, dass es sich bei den lipophilen Konstriktionen nicht um Größenausschlussfilter handelt (4.1.4).

AQPs haben einen natürlichen Protonen- und Kationenfilter; durch Einbau von wenigen Mutationen ist es jedoch möglich, aus dem Wasserkanal AQP1 einen Protonen- und Kationenkanal zu generieren (Beitz et al, 2006; Wu et al, 2009). Bisher gibt es noch keine umfangreichen Untersuchungen zu den lipophilen Konstriktionen der FNTs. Die hohe Konservierung der verantwortlichen Aminosäuren zieht ganz klar Schlüsse auf ihre essentielle Funktion als Wasser- und Ionenbarriere – doch ist es möglich, diese Barriere durch das Erweitern der Engstellen zu manipulieren? Betrachtet man *FocA*, sind maßgeblich für die Verengung F75 und F202 auf der extrazellulären Seite und L89 sowie V175 auf der zytoplasmischen Seite verantwortlich (Abb. 5.4). Eine Verkleinerung der Aminosäuren zu Alanin hat einen starken Einfluss auf das Profil des Transportpfades, ein Austausch der beiden cytoplasmischen Positionen zu Alanin führt zu einem Transporterprofil, welches dem des humanen AQP1 ähnelt (Abb. 5.4 B). Auch die Einführung von polaren Resten wie Serin ist denkbar, welche die Abschirmung geladener Teilchen herabsetzt. Bei einer praktischen Umsetzung ist natürlich zu klären, ob diese massive Veränderung des Transportpfades weiterhin einen funktionellen Transport zulässt, allerdings müsste die Erweiterung der Engstellen zur Wasserleitfähigkeit führen.

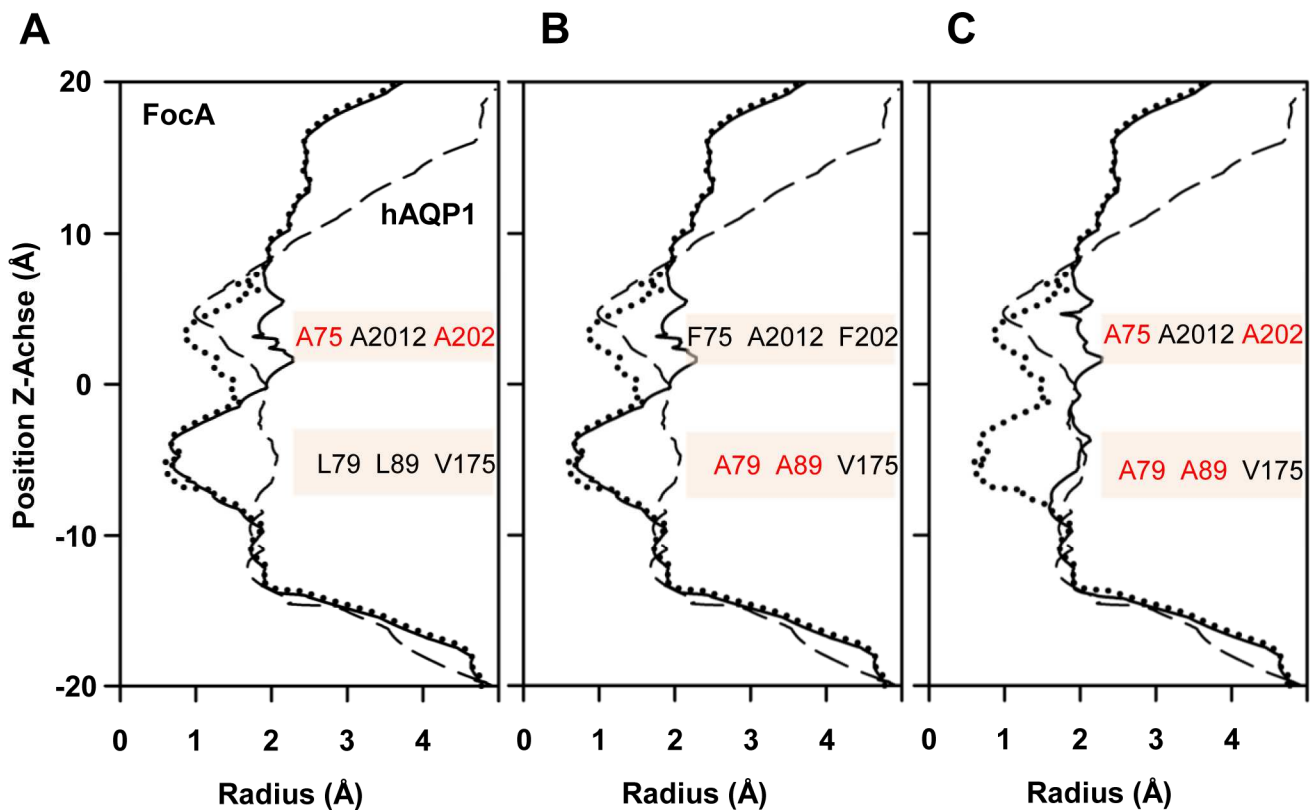


Abb. 5.4 Transporterprofile von FocA und Mutanten sowie hAQP1

Es wurde der durchschnittliche Radius der Transportpfade mit HOLE[®] (Smart et al, 1996) berechnet für FocA (gepunktete Linie), (A) FocA F75A F202A, (B) FocA L79A L89A, (C) FocA F75A L79A L89A F202A (jeweils durchgezogene Linie) und hAQP1 (gestrichelte Linie). Rot markiert sind die Konstriktionsstellen. Es wurden die Kristallstrukturen PDB # 3KCU und # 1J4N benutzt.

5.3 Ein FNT-Transportmodell

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zum Anionen-Protonen-Symport, der elektrostatischen Anziehung, am Mechanismus beteiligten Aminosäuren, Substrataziditäten, der Rolle des N-Terminus und potentiell *gating* durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse lassen zu, ein darauf basiertes Transportmodell der FNTs zu erarbeiten.

5.3.1 Substratanionen-Protonen-Symport

Vorherige Studien haben ein N-terminal gesteuertes *gating* vorgeschlagen (Lü et al, 2011), bei dem die N-terminale Domäne helikale Strukturen annimmt und im sauren pH-Bereich die Pore verschließt, während im Neutralen eine „offene“ Konformation vorliegt, bei der der N-Terminus unstrukturiert ist.

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Studien kann dies widerlegt und ein offener Kanal über den gesamten getesteten pH-Bereich im Neutralen und Sauren nachgewiesen werden (4.3). Dies wird ebenfalls durch molekulardynamische Simulationen bestätigt, die zeigen, dass der N-Terminus unabhängig von seiner Struktur nicht in der Lage ist, die Pore soweit zu verschließen, dass diese nicht mehr für Substrate zugänglich ist (Lv et al, 2013).

Das *gating* wurde weiterhin durch elektrophysiologische Messungen begründet, die einen Verlust des elektrogenen Transportes im aziden pH-Bereich zeigten (Lü et al, 2011; Lü et al, 2012a). Der elektrogene Formiattransport via FocA konnte im neutralen pH-Bereich gemessen werden, zeigte jedoch einen rapiden Abfall, sobald der pH-Wert kleiner als 5,6 war - dies wurde als Schließen des Transporters interpretiert. Messungen in dieser Arbeit zeigen, dass durch eine erhöhte Protonengradienten im sauren Medium der Transport neutraler Ameisensäure dominiert (4.3). Dabei ist das Eintreten dieses elektroneutralen Formiat-Protonen-Symports abhängig vom FNT-Vertreter, was bei den pH-abhängigen Substrataufnahmeprofilen von FocA und PfFNT ersichtlich ist (4.5.1).

Die Zerstörung des Protonengradienten durch Zugabe von Protonophoren führt zu verringerten Transportraten, die sich im Bereich nichttransformierter Zellen befinden (4.3.3). Dies kann über den kompletten pH-Bereich, also auch unter neutralen Bedingungen beobachtet werden, was darauf hinweist, dass der überwiegende Transportmechanismus über einen Anionen-Protonen-Symport verläuft.

5.3.2 Elektrostatische Anziehung

Mutationsanalysen des Poreneingangs dieser Arbeit haben dargelegt, dass durch die Änderung des positiven elektrostatischen Feldes am Poreneingang die Substrataffinität stark herabgesetzt wird (4.4.4).

Anionen werden von der positiven Elektrostatik des FNTs angezogen. Das Feld resultiert aufgrund der Helix-Dipolmomente in den L2- und L5-Bereichen (Wang et al, 2009), des eventuell protonierten zentralen Histidin (Lü et al, 2012a; Lv et al, 2013) sowie dem konservierten Lysin in der extrazellulären Vestibüle (Abb. 5.5). Es ist zu sehen, dass die Poreneingänge aller dargestellten FNTs auf der extrazellulären Seite leicht positiv geladen sind. Zwar zeigt FocA ein eher negatives elektrostatisches Feld auf der extrazellulären Seite, jedoch ist auch hier im Bereich der Poreneingänge ein positives elektrostatisches Feld zu vorhanden.

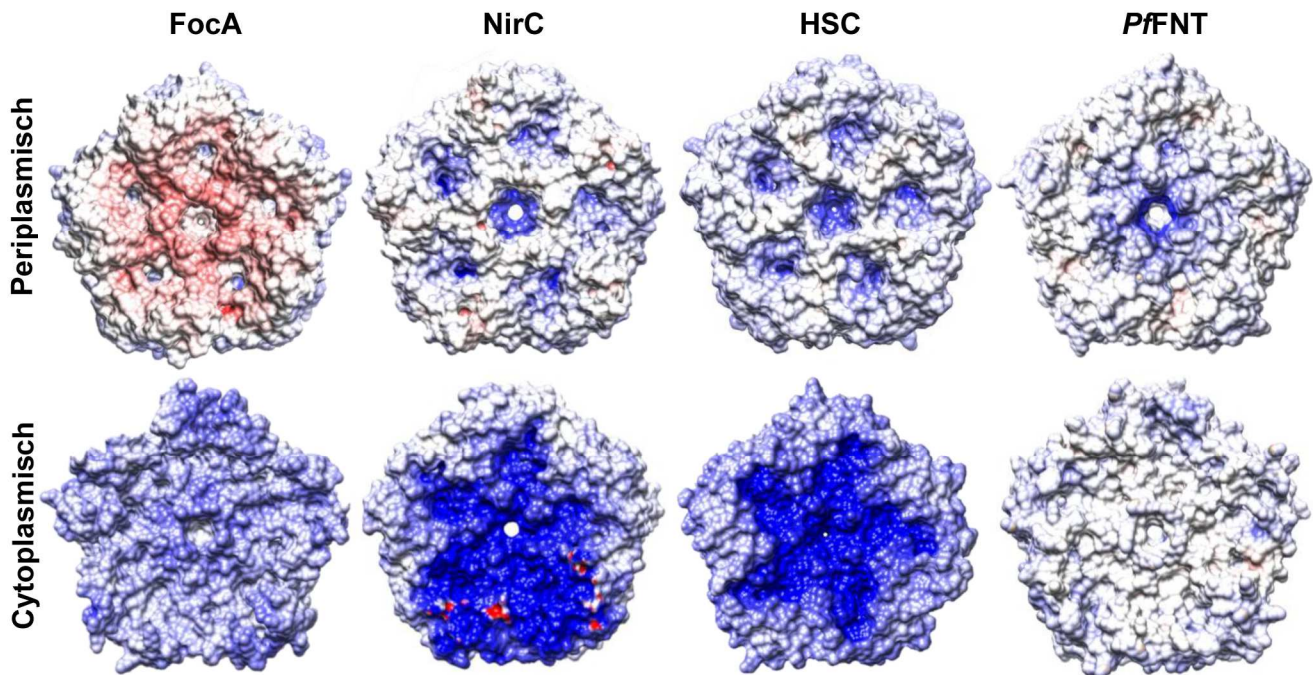


Abb. 5.5: Poisson-Boltzmann-elektrostatische Profile ausgewählter FNTs

Negative Ladungen werden rot angezeigt, positive Ladungen sind blau schattiert. Die Berechnung und Darstellung wurde mit dem APBS *tool* der Chimera[®] Software durchgeführt. Es wurden folgende PDB-Strukturen verwendet: 3KLY (FocA), 4FC4 (NirC), 3TDO (HSC) sowie ein bei SWISSMODEL[®] erstelltes Modell von PfFNT, basierend auf 3KCU.

5.3.3 Verschiebung der Substratazidität und Protonierung des Anions

Woher stammt das Transport ermöglichende Proton? Zunächst standen mehrere Möglichkeiten zur Auswahl. Im Fokus der bisherigen experimentellen und molekularinformatischen Studien (Lü et al, 2013; Feng et al, 2012) befand sich das in der Pore befindliche zentrale Histidin im L2-*loop*. Aufgrund der auffälligen Position innerhalb des Transportpfades wurde dem Histidin nach Aufklärung der ersten Kristallstrukturen die Aufgabe der Protonierung zugesprochen (Wang et al, 2009; Waight et al, 2010). Eine Mutation zu Phenylalanin zeigte einen Funktionsverlust des Transporters, was die These unterstrich (Lü et al, 2012a; Hunger et al, 2014).

Das Histidin wurde bisher als hoch konserviert bezeichnet. Jedoch sind FNTs in *Entamoeba histolytica* und *Bacillus thuringiensis* gefunden worden, die an dieser Position ein Asparagin und Glutamin besitzen, sodass die Frage aufkommt, ob das Histidin eine essentielle Funktion für die Protonierung haben kann. Ein Funktionsnachweis der beiden Transporter würde die essentielle Rolle des Histidins für den Transport revidieren.

Das Ändern des Histidins zu Asparagin in FocA und weiteren Aminosäuren in PfFNT führte zu einem Verlust der Funktion (4.4.2). Durch die erfolgten Experimente ist keine Aussage bezüglich des Protonentransfers möglich, jedoch ist dadurch die essentielle Funktion des Histidins für die Aufrechterhaltung der funktionellen Transporterstruktur in FocA und PfFNT bestätigt worden. pK_S -Berechnungen des DEPTH-Servers haben für das zentrale Histidin einen pK_S -Wert < 2 ermittelt (4.5.3), was ein Hinweis darauf ist, dass es nicht für die Protonierung zuständig sein kann. Außerdem ist es energetisch auch höchst unwahrscheinlich, dass polare Aminosäuren innerhalb einer lipophilen Proteinumgebung und innerhalb der Membran geladen vorliegen.

Vollkommen konserviert liegt hingegen das Lysin im Poreneingang vor, was für eine wichtige Rolle in der Proteinstruktur oder des Substrattransports spricht. Lysin ist jedoch eine starke Base mit einem pK_S -Wert von 10,5 im wässrigen Medium. Die Basizität ist somit sehr groß, um für ein Substrat mit einem pK_S -Wert von 5 oder kleiner als Protonendonator zu fungieren. In den letzten Jahren konnten starke pK_S -Veränderungen von Lysinen innerhalb von Proteinen ermittelt werden, dabei wurden sogar Verschiebungen um bis zu 5 pK_S -Einheiten beobachtet (Bashford & Karplus, 1990; Ho et al, 2009; Isom et al, 2011). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass ein internes Lysin der lichtinduzierten Protonenpumpe aus *Exiguobacterium sibiricum* als Protonendonator der retinalen Schiffschens Base dient (Balashov et al, 2013). Diese starken pK_S -Verschiebungen resultieren aus der veränderten Umgebung des Aminosäurerestes gegenüber der normalen wässrigen Umgebung. In weniger polaren und polarisierbaren Umgebungen wird die neutrale Form gegenüber der geladenen Form energetisch begünstigt. Dies bedeutet, dass saure Gruppen höhere und basische Gruppen niedrigere pK_S -Werte gegenüber dem wässrigen Medium aufweisen (Dwyer et al, 2000; Fitch et al, 2002). Mithilfe der bioinformatischen Berechnung des DEPTH-Servers (Chakravarty & Varadarajan, 1999) wurde eine Verschiebung um 1-3 pK_S -Einheiten des konservierten Lysins im Poreneingang ermittelt. Eine genauere experimentelle Bestimmung der veränderten Basizität des Lysins wäre jedoch wünschenswert. Dies wäre zum Beispiel über Titrations der chemischen Verschiebung mit NMR-Messungen oder Modifikationen mit MTSEA und MTSES möglich (Hausmann et al, 2013).

Trotz alledem legen die bisherigen Untersuchungen nahe, dass das Lysin im Poreneingang des FNTs nicht für die Protonierung zuständig ist (4.5.3).

Solvatisierungssimulationen und Distanzmessungen zwischen Bulkwasser und Lysin lassen vielmehr darauf schließen, dass das neutralisierende Proton vom Bulkwasser zur Verfügung gestellt wird (4.5.3). Das Substrat wird vom Bulkwasser abgetrennt, sobald es sich im lipophilen Hohlraum des Transporters befindet. Bei der experimentellen Ermittlung der veränderten Substratazidität (4.5.1) weisen interessanterweise größere Substrate auch größere pK_S -Verschiebungen auf. Dies zeigt,

dass größere Substrate eine höhere Tendenz der Protonierung erfahren, da sie möglicherweise die Lipophilie der Vestibüle durch stärkere Abschirmung vom Bulkwasser erhöhen.

Bereits 1920 konnte Max Born mithilfe der Hydratationswärme den Zusammenhang zwischen einer pK_S -Verschiebung und den dielektrischen Konstanten des umgebenden Mediums ϵ_s und Wasser ϵ_w darlegen (Born, 1920; Sarmini & Kenndler, 1999; Warshel & Russell, 1984):

$$\Delta G^0 = \frac{N z^2 e^2}{2 r} \times \left(\frac{1}{\epsilon_s} - \frac{1}{\epsilon_w} \right) \quad \text{und} \quad \Delta G = 2,303 RT \Delta pK_S$$

was sich vereinfacht zu:

$$\Delta pK_S = \frac{122}{r} \times \left(\frac{1}{\epsilon_s} - 0,0128 \right) \quad \text{beziehungsweise} \quad \epsilon_s = \frac{61}{\Delta pK_S + 0,7808}$$

Dabei ist N die Avogadro Konstante, z die Ladungsnummer, e die Elementarladung, r der Ionenradius (welcher für eine Carboxylgruppe 2 Å beträgt), R die Gaskonstante und T die absolute Temperatur. Da die Dielektrizitätskonstante von Wasser bekannt ist ($\epsilon_w = 78,3$), können mithilfe dieser Überlegung die dielektrischen Konstanten innerhalb des Proteins berechnet werden. Experimentell wurden ΔpK_S -Werte zwischen $1 \pm 0,5$ für Formiat, 2 für L-Laktat und $2,3 \pm 0,5$ in Fluoracetat bestimmt (4.5.1), somit ergeben sich Dielektrizitätskonstanten von $\epsilon_s = 34,3$ für Formiat, $\epsilon_s = 21,9$ für L-Laktat und $\epsilon_s = 19,8$ für Fluoracetat. Für Acetat konnte keine Dielektrizitätskonstante bestimmt werden, da der ermittelte pK_{S2} -Wert kleiner als der pK_{S1} -Wert von 4,8 ist und somit nicht dem aufgeführten Modell entspricht.

Ein hydrophober Proteinkern wird durch dielektrische Konstanten von 2-10 charakterisiert (Mertz & Krishtalik, 2000). Somit liegen die ermittelten dielektrischen Konstanten des FNT-Poreneingangs in einem Bereich, der darauf schließen lässt, dass Substrate einen erheblichen, aber immer noch moderaten Anstieg der Lipophilie entlang des Transportpfades erfahren. Dies zeigt, dass die Lipophilieveränderung zusammen mit der elektrostatischen Anziehung und einer niedrigen Substrataffinität im Einklang zueinander stehen, um einen effizienten Transport bei geringem Energieaufwand zu ermöglichen.

5.3.4 Modell des Mechanismus

Auf Grundlage der zuvor erläuterten Erkenntnisse kann folgender Mechanismus für die FNTs angenommen werden (Abb. 5.6):

Das Substratanion wird elektrostatisch vom Lysin im Poreneingang angezogen. Im hydrophoben Milieu des Proteins kommt es aufgrund der dielektrischen Verschiebung zu einer verringerten Substratazidität, die eine Protonierung des Substrates erleichtert. Das umgebende Bulkwasser stellt ein Proton zur Verfügung, was zu einer Neutralisierung des Substrates führt. Das dadurch ungeladene Substrat kann nun die lipophilen Engstellen passieren.

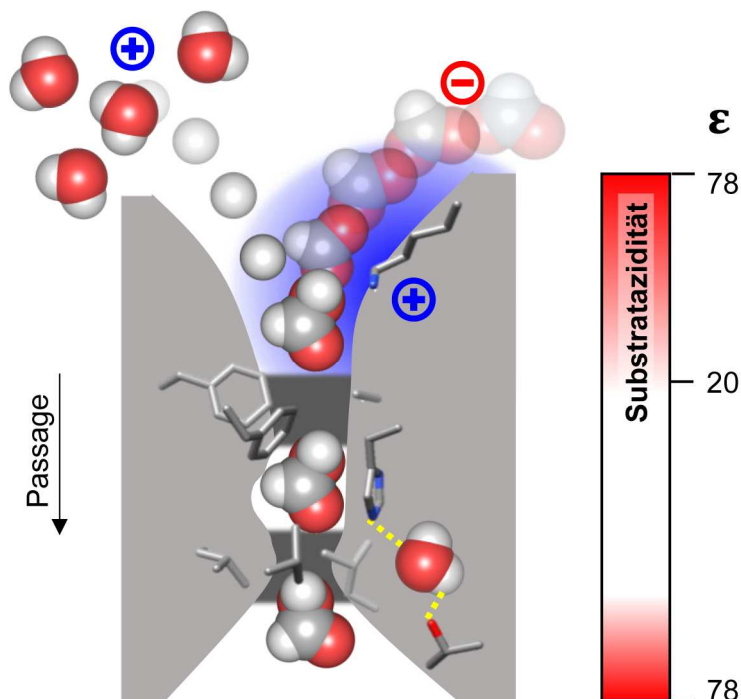


Abb. 5.6: Schematischer Mechanismus des Substrattransports der FNTs

Elektrostatische Anziehung des Substratanions (hier Formiat) zum FNT, gleichzeitige dielektrische Verschiebung der Substratazidität, welche zur Neutralisation führt, bedingt durch einen Proton-Transfer des Bulkwassers, Passage des neutralen Substrates (hier Ameisensäure) durch die lipophilen Engstellen. Dargestellt mit Pymol[®].

5.3.5 Direktionalität

Der postulierte Mechanismus bezieht sich auf den Substratimport, der mögliche Exportmechanismus ist bis jetzt jedoch noch nicht vollständig geklärt. Intrazellulär befindet sich innerhalb der FNT-Struktur kein für eine bestimmte Position konserviertes Lysin, doch liegen in den jeweiligen N-Termini mehrere Lysine, die für die Funktion der elektrostatischen Anziehung verantwortlich sein könnten (Abb. 5.7). Das Verkürzen des N-Terminus resultiert in einem Verlust des pH-abhängigen Substratimports, ebenso wie der Austausch einzelner Lysine im N-Terminus von FocA (4.4.5). Dies zeigt, dass die jeweiligen Lysine eine große Bedeutung für den Transport spielen, die genauere Funktion bisher jedoch nicht spezifiziert wurde. Die Untersuchung der N-terminalen Lysine in *Pf*FNT ist ausstehend.

Poisson-Boltzmann-Elektrostatik-Berechnungen für verschiedene FNT-Vertreter (Abb. 5.5) zeigen, dass die zytoplasmische Seite jeweils positiver geladen ist als die extrazelluläre Seite. Somit sollte dort die Anziehung/Affinität von Anionen größer sein, was zu einer Erleichterung des Substratexports führen könnte.

Der trichterförmige Eingang der zytoplasmischen Seite ist weiter und kürzer aufgebaut als auf der extrazellulären Seite, sodass die dielektrische Verschiebung eventuell niedriger ausfällt; dies könnte durch die erhöhte elektrostatische Anziehung ausgeglichen werden. Auch die konservierte extrazelluläre Triade aus Lysin, Glutamat und Asparagin im Poreneingang ist im zytoplasmischen Bereich nicht so stark konserviert. Im Hydrogensulfidkanal HSC konnte diese jedoch identifiziert werden, was auf eine Funktion für den Substratexport schließen lässt (Czyzewski & Wang, 2012). Neueste Untersuchungen zeigen, dass in lebenden Malaria-Parasiten nach *Pf*FNT-Inhibition die intrazelluläre Protonenkonzentration ansteigt (Hapuarachchi et al, 2017). Dies ist ein indirekter Beweis für den Laktat-Protonen-Symport in Exportrichtung.

Da die strukturellen Daten für den zytoplasmischen Proteinbereich diffuser sind als im Poreneingang, sind weitere Untersuchungen für eine Aufklärung nötig.

Es ist ein Modellsystem wünschenswert, mit dem Membranproteine *inside out* und somit das Exportverhalten untersucht werden kann.

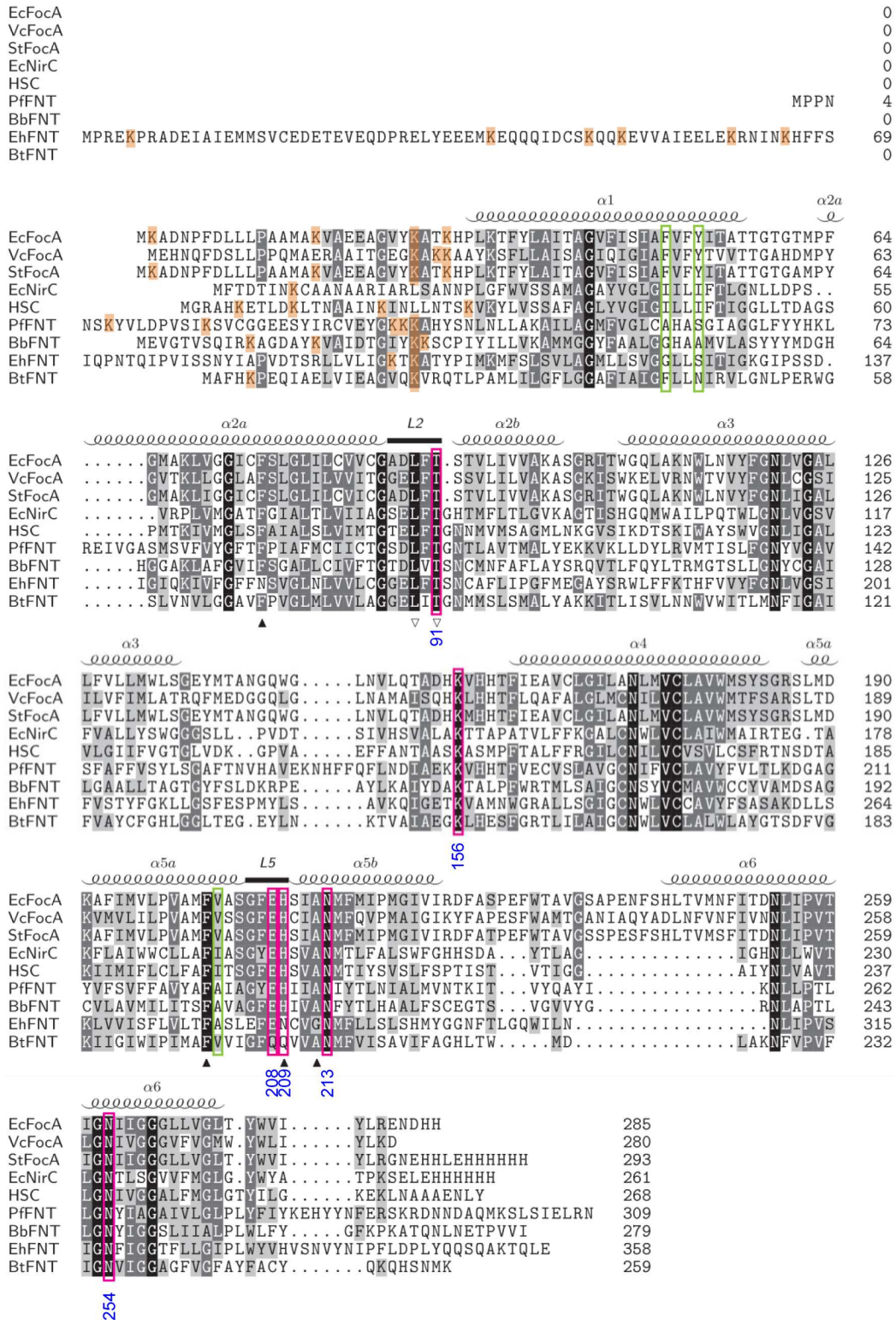


Abb. 5.7: Alignment ausgewählter FNTs

Orange sind Lysine im N-Terminus hervorgehoben, grün zeigt die untersuchten Positionen des Selektivitätsfilters an, magentafarben sind die möglicherweise am Mechanismus beteiligten Aminosäuren umrandet (Positionen in FocA blau beschriftet). Nach oben gerichtete Dreiecke markieren die extrazelluläre lipophile Konstriktion, nach unten gerichtete die zytoplasmische Konstriktion. Dargestellt mit TEXshade[©].

Der oben postulierte Transportmechanismus konnte auf FocA, *PfFNT* und *BbFNT* übertragen werden. Doch ist er universell für alle FNTs relevant? Schließlich nehmen die einzelnen FNTs unterschiedliche Rollen im jeweiligen physiologischen Energiemetabolismus ein. Während bei FocA, *PfFNT* und HSC vor allem der Export physiologisch entscheidend ist, scheint für NirC vorrangig der Import relevant zu sein. Für den Nitrittransporter wurde eine pH-Unabhängigkeit beschrieben (Rycovska et al, 2012), die im Hefe-basierten Aufnahmeassay von ¹⁴C-Formiat bestätigt werden konnte (Daten von André Gollmack in diesem Arbeitskreis). Es zeigte sich eine abgeschwächte sigmoidale Kurve mit nur leicht erhöhten Transportraten im sauren pH-Bereich. Dies könnte dafür sprechen, dass die Protonierung des Substrates durch eine dielektrische Verschiebung hier im Hintergrund steht und vor allem die erleichterte Diffusion der protonierten Form vorliegt. Nitrit hat einen pK_S-Wert von 3,3, was ebenfalls dafür sprechen würde, dass im untersuchten pH-Bereich die dielektrische Verschiebung schwer zu erkennen ist. Das konservierte Lysin im Poreneingang liegt in der Kristallstruktur im Vergleich zu FocA näher am benachbarten Glutamat sowie anliegenden Asparaginen (N213 und N254 in FocA) (Lü et al, 2012b). Durch diese erhöhte Stabilität kann das Lysin also hier veränderte Eigenschaften aufweisen. Der HSC-Kanal weist die gleiche strukturelle Auffälligkeit auf (Czyzewski & Wang, 2012). Untersuchungen mit den natürlichen Substraten Nitrit und Hydrogensulfid geben möglicherweise mehr Aufschluss über den genauen Mechanismus.

5.4 Übertragung des FNT-Transportmechanismus auf andere Proteinfamilien

5.4.1 Kanäle oder Transporter?

Ausstehend ist die Frage, ob FNTs Transporter sind oder als Kanäle eingestuft werden sollten. Während Kanäle sehr niedrige Aktivierungsenergien von weniger als 5 kcal mol⁻¹ aufweisen, zeigen Transporter höhere Aktivierungsenergien von 11-27 kcal mol⁻¹ (Agre et al, 2002; Liu et al, 1996). Für die FNTs wurden niedrige Aktivierungsenergien von etwa 2 kcal mol⁻¹ ermittelt (4.5.2). Auch die bisher ermittelten niedrigen Substrataffinitäten sind typisch für Kanäle (4.3.5). Ebenfalls wurden abgesehen vom N-Terminus geringe Konformationsänderungen entlang des Transportpfades beobachtet. Beispielsweise wurde der Hydrogensulfidkanal bei verschiedenen pH-Werten 9, 7,5 und 4,5 kristallisiert, um mögliche pH-abhängige Konformationsänderungen zu detektieren, jedoch blieb die Konformation der Pore unverändert (Czyzewski & Wang, 2012). Kanäle formen eine kontinuierliche Pore, welche meist durch Selektivitätsfilter und *gates* kontrolliert sind. Im offenen

Zustand können sie nur die Membrandiffusion entlang des Gradienten erleichtern und weisen Raten bis zu 10^8 Molekülen pro Sekunde auf.

Sekundär aktive Transporter unterliegen oftmals einer starken Konformationsänderung, sobald das Substrat an einer spezifischen Stelle bindet („*alternating-access*“-Mechanismus). Pro Transportzyklus wird meist nur ein einziges Substratmolekül transportiert, sodass Transporter üblicherweise Raten von 10^2 bis 10^5 Molekülen pro Sekunde aufweisen. Die berechneten Raten (Kapitel 5.1) befinden sich eher im Bereich sekundär aktiver Transporter und sind Kanal-untypisch. Auch ist die Abhängigkeit vom Protonengradienten ein typisches Merkmal des Symportmechanismus sekundär aktiver Transporter sowie die Tatsache, dass kein *gating*-Mechanismus vorliegt.

Nach Zusammenstellen bereits bekannter und neu ermittelter Merkmale der FNTs ist somit ersichtlich, dass diese nicht in das klassische Transporter-Kanal-Schema einzuordnen sind, sondern eine neue Klasse von Membranproteinen darstellt, die zwischen Kanälen und Transportern einzuordnen ist.

5.4.2 Chloridtransporter

Das Problem, neu identifizierte Membranproteinfamilien nicht eindeutig in die klassische Kanal-Transporter-Nomenklatur einordnen zu können, tritt mit den FNTs nicht zum ersten Mal auf. Daher wurden die FNTs bereits mit der Membranproteinfamilie der Chloridkanäle (CIC) verglichen (Waight et al, 2013).

Chlorid-Kanäle der CIC-Familie (Transporterklasse 2.A.49) kommen ubiquitär in Eukaryoten und Prokaryoten vor, neun Vertreter gibt es in Säugetieren (Pusch, 2004). Kristallstrukturen, die bisher ausschließlich von bakteriellen CICs generiert wurden, geben Einblick in die Struktur und den möglichen Mechanismus (Miller, 2006). Sie sind als Homodimere in die Membran eingebaut und besitzen eine komplexe Topologie mit 18 Transmembranspannen; jede Untereinheit bildet eine individuell arbeitende Pore (Pusch, 2004). Die Substratselektivität beschränkt sich auf kleine, negativ geladene Moleküle wie Cl^- , Br^- , I^- , NO_3^- - größere Anionen wie H_2PO_4^- und SO_4^- sowie Kationen werden ausgeschlossen (Jentsch et al, 2005).

Einige Vertreter der CIC-Familie funktionieren als „*gated channels*“, die abhängig von Spannung, Substratkonzentration und pH durch Konformationsänderungen einen „offenen“ und „geschlossenen“ Zustand aufweisen, sodass Chlorid entlang des Gradienten die Membran passieren kann (Dutzler, 2007). Andere CIC-Vertreter hingegen sind elektrogene Cl^-/H^+ -Antiporter, das heißt sie tauschen Chlorid und Protonen durch mehrere Konformationsänderungen aus (Abeyrathne et al, 2016). Trotz struktureller Gemeinsamkeiten innerhalb einer Proteinfamilie sind Vertreter sowohl Kanäle als auch

Transporter, was aufzeigt, dass auch bei den FNTs verschiedene Transportmechanismen vorhanden sein können.

5.4.3 Aquaporine

AQPs stellen eine große Membrankanalfamilie dar, die in allen Lebewesen vorhanden ist (Abascal et al, 2014). Neben Wasser wurden bereits viele weitere Substrate der AQPs entdeckt, darunter kleine ungeladene Polyole wie Glycerol, Harnstoff und Wasserstoffperoxid, aber auch gelöste Gase wie Ammoniak oder Kohlenstoffdioxid (Rambow et al, 2014). Protonen und andere Kationen werden von den AQPs ausgeschlossen.

Einige AQPs besitzen ein positiv geladenes, elektrostatisches Feld auf der extrazellulären Seite, was zum einen Kationen abstößt, gleichzeitig jedoch Anionen anzieht. Für das Aquaglyceroporin 9 konnten eine Reihe von Soluten als Substrate nachgewiesen werden, darunter befinden sich neben Harnstoff und Polyolen auch Monocarboxylate wie Laktat und 2-Hydroxybutyrat (Tsukaguchi et al, 1999). Untersuchungen von Rothert et al. zeigen, dass Laktat-Anionen durch die stark positive, elektrostatische Oberfläche des AQP9, bedingt durch Arginine, angezogen werden. Dadurch ist die lokale Konzentration von Laktat/Milchsäure an der Oberfläche erhöht und neutrale Milchsäure kann den Kanal durchqueren (Rothert et al, 2017). Die Laktataufnahme ist nicht vom Protonengradienten abhängig, was dafür spricht, dass es nicht zu einer aktiven Protonierung des Substratanions kommt. Weitere pH-Messungen mit Acetat und 2-Hydroxybutyrat zeigen, dass die Acetataufnahme ausschließlich von der protonierten Fraktion abhängt, während es bei 2-Hydroxybutyrat zu einer lokalen Ansammlung der protonierten Form kommt (Rothert et al, 2017).

Somit zeigt AQP9 einen den FNTs sehr ähnlichen, aber vereinfachten Mechanismus des Substrattransports: Elektrostatische Anziehung der Anionen in die Kanalvestibüle erhöht die lokale Konzentration an der Oberfläche und anschließend die Passage des neutralen Substrates (Rothert et al, 2017; Rambow et al, 2014). Auch einige Aquaglyceroporine aus *Lactobacillus plantarum* weisen eine positive elektrostatische Oberfläche auf der extrazellulären Seite auf; hier konnte ebenfalls eine Laktatleitfähigkeit nachgewiesen werden (Bienert et al, 2013)

Somit sind AQPs neben den Monocarboxylattransportern und den FNTs die dritte Proteinfamilie, die in den transmembranären Monocarboxylattransport involviert ist. Zwar sind die beiden anderen Proteinfamilien wesentlich besser auf den Monocarboxylattransport spezialisiert, jedoch können bei deren Abwesenheit bestimmte AQPs aufgrund ihrer Elektrostatik und Kanalstruktur die Rolle des Transports übernehmen.

5.4.4 Ammoniumtransporter

Wenn wir uns von den Anionentransportern wegbewegen, gibt es eine Membranproteinfamilie, die einen den FNTs sehr ähnlichen Transportmechanismus aufweist. Die Amt/MEP/Rh-Proteinfamilie der Ammoniumtransporter kommt ubiquitär in Pflanzen, Bakterien, Hefen und Menschen (Rhesusproteine) vor und übernimmt dort die Aufgabe des Transports über Membranen von Ammonium als wichtige Stickstoffquelle im Metabolismus (Thomas et al, 2000). Ammoniumtransporter liegen als Trimere vor, jedes Monomer setzt sich aus 11 Transmembran-spannen zusammen mit einem extrazellulären N-Terminus (Blakey et al, 2002; Khademi et al, 2004). Sie transportieren ausschließlich Ammonium ($pK_B = 4,8$) und Methylammonium ($pK_B = 3,4$), zeigen eine hohe Substrataffinität im einstelligen mikromolaren Bereich und besitzen eine negative Elektrostatik auf der extrazellulären Seite (Hackette et al, 1970; Neuhauser et al, 2014). Diese Eigenschaften sind auf die allgemeinen Anforderungen des Kationentransports zurückzuführen (5.2). Auch diese Membranfamilie wurde zwar zunächst als „Transporter“ eingestuft, jedoch zeigte die erste Kristallstruktur des Ammoniumtransporters aus *E. coli* AmtB keine Konformationsänderungen bei unterschiedlichen Bedingungen, was - wie bei den FNTs - eher ein Zeichen für einen Kanal ist (Khademi et al, 2004). pH-sensitive Fluoreszenzmessungen zeigten einen „Transport“ von Ammoniak, nicht Ammonium, was auf folgenden Mechanismus schließen lässt: Ammonium wird durch die negative Elektrostatik angezogen, ein Proton wird entzogen, sodass das neutrale Ammoniak den hydrophoben Transportpfad passieren kann (Khademi et al, 2004; Soupene et al, 1998; Zheng et al, 2004). Dieses Modell steht im völligen Einklang mit dem in dieser Arbeit gefundenen Transportmodell der FNTs.

Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften von schwachen Säuren und Basen gibt es jedoch einige Unterschiede zwischen der FNT- und Amt-Familie. Die Substrate liegen bei physiologischem pH-Wert unterschiedlich geladen vor. Daher zeigen Ammoniumtransporter eine negative Elektrostatik, die unter anderem auf ein konserviertes Aspartat zurückzuführen ist, welches mit dem Rückgrat zum Transportpfad gerichtet vorliegt (Khademi et al, 2004).

Durch die Protonierung einer schwachen Säure, $A^- + H^+ \rightarrow HA$, werden zwei Ladungen durch die Reaktion entzogen. Die Neutralisation einer schwachen Base, $HB^+ \rightarrow B + H^+$, verändert nicht die Anzahl der Ladungen. Die Protonierung eines Säureanions ist somit energetisch günstig, da durch die Reaktion Wassermoleküle der Hydratationshülle frei werden und dadurch die Entropie erhöht wird. Die Neutralisation der protonierten Base hingegen erfordert einen enthalpischen Beitrag. Für AmtB wurde eine sehr niedrige Aktivierungsenergie von $1,6 \text{ kcal mol}^{-1}$ ermittelt, was unseren ermittelten Aktivierungsenergien vom Formiattransport via FocA und PfFNT entspricht (Javelle et al, 2005).

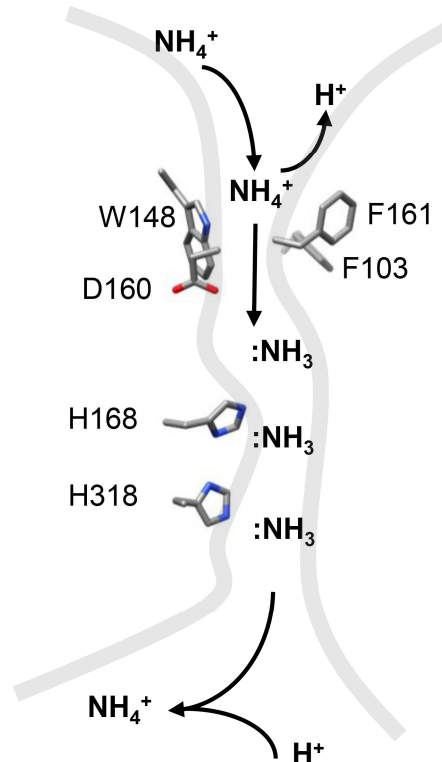


Abb. 5.8 Schematischer Transportmechanismus der Ammoniumtransporter, adaptiert nach (Khademi et al, 2004)

Elektrostatische Anziehung des Ammoniumions durch D160, Deprotonierung durch dielektrisch bedingte Basizitätserniedrigung, Passage des neutralen Ammoniaks durch lipophilen Filter F103, W148 und F161. Die zentralen Histidine H168 und H318 sind ungeladen und dienen als polare Bindestellen. Modell erstellt mit der Kristallstruktur von AmtB (PDB # 1U7G).

Aufgrund des Protonierungsschrittes profitieren Säureanionen von einem höheren Protonengradienten, dies zeigt sich experimentell durch die pH-abhängige Substrataufnahme mit höheren Aufnahmezeiten im aziden Medium (4.3.1). Schwache Basen wie Ammoniak hingegen ziehen aus einem erhöhten Protonengradienten keinen Nutzen; daher zeigen sie auch kein pH-abhängiges Verhalten (Ludewig et al, 2002). Dieser „Nachteil“ wird durch ihre erhöhte Substrataffinität ausgeglichen.

Trotz der physiologisch bedingten Unterschiede gibt es strukturell viele Ähnlichkeiten zwischen diesen beiden Familien. Ammoniumtransporter besitzen ebenfalls eine lipophile Konstriktion, die sich aus zwei Phenylalaninen zusammensetzt. Diese dient dem Ausschluss von geladenen Teilchen. Durch schnelle Bewegungen dieser Aminosäure-Seitenketten können jedoch ungeladene Moleküle passieren, ebenso wie es für die FNTs angenommen wird (Javelle et al, 2008; Lü et al, 2012a). Der Transportpfad ist schmal, unflexibel und lipophil aufgebaut, ausgenommen von zwei zentral sitzenden Histidinen, die essentiell für die Funktionalität sind (Javelle et al, 2006). Auch hier wird

davon ausgegangen, dass diese innerhalb der lipophilen Umgebung ungeladen vorliegen (Ishikita & Knapp, 2007).

Eine weitere essentielle Gemeinsamkeit dieser beiden Proteinfamilien stellt der trichterförmige Poreneingang dar, welcher für eine Abschirmung zur wässrigen Umgebung sorgt. Dies ermöglicht die Substratneutralisation durch einen Protonentransfer, basierend auf einer dielektrisch bedingten Verschiebung der Substratazidität oder -basizität.

All diese Gemeinsamkeiten sprechen dafür, die FNTs mit den Amt/MEP/Rh-Proteinen in einer mechanistischen Klasse zusammenzuführen.

5.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnten zentrale Fragen des FNT-Transportmechanismus und der Substratselektivität geklärt und diese neuen Erkenntnisse in einem Modell zusammengefasst werden.

Es konnte ein Substratselektivitätsfilter oberhalb der extrazellulären Konstriktion identifiziert werden, welcher über das Prinzip des Größenausschlusses funktioniert. Dabei zeigte sich, dass nicht nur diese Filterebene, sondern die Form des Poreneingangs entscheidend dafür ist, welche Substrate passieren können. Durch weitere Mutationen und die mögliche Generierung der Laktatleitfähigkeit bei einem prokaryotischen FNT kann das Prinzip des Größenausschlusses bestätigt werden. Der FNT-Ladungsfilter, welcher über die zwei lipophilen Konstriktionsstellen definiert ist, schließt Wasser und Kationen aus. Seine Rolle könnte über Mutationsanalysen, welche den Filter erweitern oder polarer machen, weiter evaluiert werden (5.2.2).

Ein konserviertes Lysin im Poreneingang ist für die elektrostatische Anziehung der Substratanionen verantwortlich. Die Untersuchung der genauen Funktion dieser für den Transport entscheidenden Aminosäure sowie weiterer Lysine im zytoplasmischen N-Terminus ist ausstehend. Die Bestimmung der Basizitätsverschiebung wäre über Titrations der chemischen Verschiebung mit NMR-Messungen möglich. Weiterhin könnte man versuchen, FocA K156C oder PfFNT K177C mit Stoffen umzusetzen, welche mit der Thiolgruppe des Cysteins reagieren. Dafür wären Substanzen wie 2-Aminoethylmethanthiosulfonat (MTSEA) oder 2-Sulfonatoethylmethanthiosulfonat (MTSES) denkbar, um positive oder negative Ladungen in den Poreneingang einzubringen (Hausmann et al, 2013) und den daraus resultierenden Effekt zu untersuchen.

Ausstehend ist außerdem die genaue Untersuchung der Direktionalität. Es ist zu klären, ob der ermittelte Mechanismus für den Import direkt auf den Substratexport übertragen werden kann, oder

ein anderer Mechanismus greift. Dazu ist ein Testsystem wünschenswert, mit dem der Substratexport untersucht werden kann. Es konnte bereits gezeigt werden, dass zellfrei hergestelltes PfFNT sich in Proteoliposomen zu über 90 % *inside out* in die Membran einbaut (Holm-Bertelsen et al, 2016), anschließend konnte bei neutralem pH das gleiche Substratprofil nachgewiesen werden wie zuvor in Hefen und Oozyten (Wu et al, 2015; Marchetti et al, 2015). Es ist zu klären, ob dieses Verhalten nur für PfFNT zu beobachten ist oder sich noch auf weitere FNTs übertragen lässt. Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der Direktionalität ist die Verwendung von *S. cerevisiae*-NY17-Zellen. Diese Hefezellen mit der sogenannten Sec 6-4-Mutation besitzen eine Störung im letzten Schritt des vesikulären sekretorischen Pfades, dem Einbau in die Plasmamembran (Walworth & Novick, 1987). Dadurch sammeln sich große Mengen an post-Golgi sekretorischen Vesikeln an, welche neu hergestellte Membranproteine enthalten. Bei den sekretorischen Vesikeln handelt es sich um eigenständige Organellen, die einen Protonengradienten entlang der Membran aufbauen können; außerdem sind die Membranproteine aufgrund des Vesikelursprungs vollständig *inside-out* angeordnet – beide Eigenschaften sind also optimal für die Untersuchung des protonen-abhängigen Exports (Ruetz & Gros, 1994).

Um den erarbeiteten Transportmechanismus weiter zu verifizieren, könnten weitere FNTs auf pH-Abhängigkeit und Protonierung untersucht werden. Unter anderem wäre die nähere Untersuchung des Nitrit-Transporters NirC, der FNTs aus *Toxoplasma gondii* oder der FNTs ohne zentrales Histidin aus *Entamoeba histolytica* und *Bacillus anthracis* maßgeblich.

Der Transportmechanismus konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits erfolgreich auf eine weitere Membranproteinklasse der Amt/MEP/Rh-Proteine übertragen werden. Darauf basierend sollte untersucht werden, ob das Konzept der vereinfachten Protonierung/Deprotonierung schwacher Säuren und Basen auch auf weitere Membranproteinklassen übertragen werden kann, vor allem im Bereich des Energiestoffwechsels wie Carboxylat- und Vitamintransport.

PfFNT stellt ein neues, valides Wirkstoffziel der glykolytischen Energiegewinnung und pH-Homöostase des Malaria-Parasiten dar. Derzeit werden potente Inhibitoren von PfFNT untersucht und weiterentwickelt, welche die Resistenz verursachende Mutation G107S umgehen können. Der aufgeklärte Transportmechanismus kann als Grundlage für die Entwicklung neuer Substrat-analoger Inhibitorklassen dienen. Für die Weiterentwicklung wären dafür Kristalldaten des plasmodialen Laktattransporters von Vorteil.

6 Zusammenfassung

Formiat-Nitrit-Transporter (FNT) sind in Mikroorganismen für den Transport von kleinen monovalenten Anionen zuständig und somit Schlüsselstoffe im Energiemetabolismus. In diesem Arbeitskreis wurde zuvor der *Plasmodium falciparum* FNT (*PfFNT*) als entscheidender Laktattransporter des Malariaparasiten identifiziert. Da FNTs nicht im Menschen vorkommen, werden sie als potentielle Wirkstoffziele gegen Infektionen von *Salmonella* oder *Plasmodium* betrachtet.

FNT-Kristalldaten zeigen eine homopentamere Struktur mit einem Transportpfad je Monomer. Der Transportpfad wird durch lipophile Aminosäuren verengt, sodass sich zwei Konstriktionen bilden, welche ein konserviertes Histidin einschließen. Ziel dieser Arbeit war das Beantworten der Frage, ob und wie Anionen protoniert werden, um die lipophilen Engstellen passieren zu können. Weiterhin wurde die unterschiedliche Substratelektivität zwischen eukaryotischen und prokaryotischen FNTs untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit erkannten bioinformatische und funktionelle Untersuchungen einen Substratelektivitätsfilter, welcher sich oberhalb der extrazellulären Konstriktion befindet und über einen Größenausschluss selektiert. Durch Punktmutationen konnte das Substratspektrum von *PfFNT* moduliert und gezeigt werden, dass sich der Selektivitätsfilter evolutionär von prokaryotischen zu eukaryotischen FNTs erweitert hat, um sich den metabolischen Anforderungen anzupassen.

PfFNT und der *E.coli*-FNT FocA wiesen pH-abhängige Transportprofile auf, die ihr Maximum der Transportraten im aziden pH-Bereich des Substrat- pK_S zeigten. Messungen mit Protonenentkopplern belegten einen Substrat-Protonen-Symport und Messungen mit schwerem Wasser bestätigten einen einfachen Protonierungsschritt für die Substratneutralisierung.

Die elektrostatische Anziehung des Substratanions konnte einem konservierten Lysin im Poreneingang zugewiesen werden. Eine Lysin-zu-Cystein-Mutante führte zu einer pH-Unabhängigkeit der Formiataufnahme via FocA.

Durch mathematische Modelle und Solvationssimulationen wurden pK_S -Verschiebungen des Substrates aufgrund einer veränderten dielektrischen Umgebung im Protein bestimmt und die Substratneutralisation Protonen des Bulkwassers zugewiesen.

Basierend auf diesen Erkenntnissen konnte folgendes Mechanismus-Modell erstellt werden: 1. Elektrostatische Anziehung des Substratanions zum FNT, 2. gleichzeitige dielektrische Verschiebung der Substratazidität, welche zur Neutralisation bedingt durch einen Proton-Transfer des Bulkwassers führt, 3. Passage des neutralen Substrates durch die lipophilen Engstellen. Dieses Modell ist komplementär mit dem der Ammoniumtransporter, es verbindet schwache Säuren und Basen neutralisierende Transporter in einer mechanistischen Klasse.

7 Summary

Formate-nitrite transporters (FNT) regulate the flow of small monovalent acids and are therefore key regulators of the energy metabolism of microorganisms. The eukaryotic *PfFNT* of *Plasmodium falciparum* was recently identified as the malaria parasite's crucial lactate transporter. Since FNTs occur only in microorganisms and not in humans, they are being considered as potential drug targets for treating *Salmonella* or *Plasmodium* infections.

Crystal data of FNTs revealed a homopentameric structure composed of five individual transporting units. Two hydrophobic constrictions occlude the transport path, which enclose the imidazole side chain of a conserved histidine.

The objective of this work was to clarify, whether and how substrate anions become protonated for passing the hydrophobic constrictions. Furthermore, it was intended to investigate the substrate selectivity of eukaryotic and prokaryotic FNTs.

Bioinformatic and functional experiments revealed a substrate selectivity filter, which is located above the extracellular constriction and selects by exclusion. The substrate spectrum of *PfFNT* was modulated by means of point mutations and confirmed the thesis that the eukaryotic selectivity filter is widened compared to the prokaryotic filter due to evolutionary changes in metabolic needs.

PfFNT and FocA revealed a pH-dependent transport profile, with maximal transport rates in the acidic pH range around the substrate pK_a . Measurements with protonophores showed a substrate/proton symport and heavy water effects indicated a single protonation step for neutralization. The electrostatic attraction of substrate anions could be assigned to an invariant lysine in the extracellular pore entrance. When changing the lysine to a neutral cysteine, a loss of pH-dependency was observed. Mathematical models and solvation simulations were used to identify shifts of substrate acidity as a result of a changed dielectric environment in the protein. It was further confirmed that the substrate-neutralizing proton is derived from bulk water.

Based on these new insights, the following model of FNT transport mechanism was established:

1. Electrostatic attraction of substrate anions to the FNT,
2. simultaneous dielectric shift of substrate acidity leading to neutralization by means of proton transfer from the bulk solvent,
3. passage of the neutral substrate via the lipophilic constrictions.

This model is complementary to that of ammonium transporters which joins weak acid and base neutralizing transporters into one mechanistic class.

8 Literaturverzeichnis

Abascal F, Irisarri I & Zardoya R (2014) Diversity and evolution of membrane intrinsic proteins. *Biochim Biophys Acta* **1840**: 1468–1481

Abeyrathne PD, Chami M & Stahlberg H (2016) Biochemical and biophysical approaches to study the structure and function of the chloride channel (ClC) family of proteins. *Biochimie* **128**: 154–162

Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A & Nielsen S (2002) Aquaporin water channels - from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* **542**: 3–16

Aikawa M, Miller LH, Johnson J & Rabbege J (1978) Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *J Cell Biol* **77**: 72–82

Andrade RP & Casal M (2001) Expression of the lactate permease gene JEN1 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genet Biol* **32**: 105–111

Arrhenius S (1889) Ueber die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. *Z Phys Chem* **4**: 226–248

Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ & McCammon JA (2001) Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10037–10041

Balashov SP, Petrovskaya LE, Imasheva ES, Lukashev EP, Dioumaev AK, Wang JM, Sychev SV, Dolgikh DA, Rubin AB, Kirpichnikov MP & Lanyi JK (2013) Breaking the carboxyl rule: lysine 96 facilitates reprotonation of the Schiff base in the photocycle of a retinal protein from *Exiguobacterium sibiricum*. *J Biol Chem* **288**: 21254–21265

Barry DN (1984) Metabolism of *Babesia* parasites in vitro. Glucose and energy metabolism of *B. bovis*. *Aust J Exp Biol Med Sci* **62**: 53–61

Bashford D & Karplus M (1990) pKa's of ionizable groups in proteins: atomic detail from a continuum electrostatic model. *Biochemistry* **29**: 10219–10225

Beckham KSH, Potter JA & Unkles SE (2010) Formate-nitrite transporters: optimisation of expression, purification and analysis of prokaryotic and eukaryotic representatives. *Protein Expr Purif* **71**: 184–189

Beckwith J (2013) The Sec-dependent pathway. *Res Microbiol* **164**: 497–504

- Beitz E (2000) TEXshade: shading and labeling of multiple sequence alignments using LATEX2 epsilon. *Bioinformatics* **16**: 135–139
- Beitz E (2006) Subfamily logos: visualization of sequence deviations at alignment positions with high information content. *BMC bioinformatics* **7**: 313
- Beitz E, Wu B, Holm LM, Schultz JE & Zeuthen T (2006) Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 269–274
- Bienert GP, Desguin B, Chaumont F & Hols P (2013) Channel-mediated lactic acid transport: A novel function for aquaglyceroporins in bacteria. *Biochem J* **454**: 559–570
- Blakey D, Leech A, Thomas GH, Coutts G, Findlay K & Merrick M (2002) Purification of the Escherichia coli ammonium transporter AmtB reveals a trimeric stoichiometry. *Biochem J* **364**: 527–535
- Born M (1920) Volumen und Hydratationswärme der Ionen. *Z Phys* **1**: 45–48
- Bray RS & Garnham PC (1982) The life-cycle of primate malaria parasites. *Br Med Bull* **38**: 117–122
- Busch W & Saier MH Jr. (2002) The transporter classification (TC) system, 2002. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **37**: 287–337
- Casal M, Paiva S, Andrade RP, Gancedo C & Leao C (1999) The lactate-proton symport of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by JEN1. *J Bacteriol* **181**: 2620–2623
- Casal M, Queiros O, Talaia G, Ribas D & Paiva S (2016) Carboxylic Acids Plasma Membrane Transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv Exp Med Biol* **892**: 229–251
- Case DA, Betz RM, Cerutti DS, Cheatham TE 3rd, Darden TA, Duke RE, Giese TJ, Gohlke H, Goetz HA, Homeyer N, Izadi S, Janowski P, Kaus J, Kovalenko A, Lee TS, LeGrand S, Li S, Lin C, Luchko T, Luo R, Madej B, Mermelstein D, Merz KM, Monard G, Nguyen H, Nguyen HT, Omelyan I, Onufriev A, Roe DR, Roitberg A, Sagui C, Simmerling CL, Botello-Smith WM, Swails J, Walker RC, Wang J, Wolf RM, Wu X, Xiao L & Kollman PA (2016) AMBER 2016. *University of California, San Francisco*
- Cassio F, Leao C & van Uden N (1987) Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **53**: 509–513
- Chakravarty S & Varadarajan R (1999) Residue depth: a novel parameter for the analysis of protein structure and stability. *Structure* **7**: 723–732

- Chakravorty D & Hensel M (2003) Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes Infect* **5**: 621–627
- Chen W & Gueron M (1992) The inhibition of bovine heart hexokinase by 2-deoxy-D-glucose-6-phosphate: characterization by ³¹P NMR and metabolic implications. *Biochimie* **74**: 867–873
- Clegg S, Yu F, Griffiths L & Cole JA (2002) The roles of the polytopic membrane proteins NarK, NarU and NirC in Escherichia coli K-12: two nitrate and three nitrite transporters. *Mol Microbiol* **44**: 143–155
- Cole J (1996) Nitrate reduction to ammonia by enteric bacteria: redundancy, or a strategy for survival during oxygen starvation? *FEMS Microbiol Lett* **136**: 1–11
- Cowman AF & Crabb BS (2006) Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* **124**: 755–766
- Cranmer SL, Conant AR, Gutteridge WE & Halestrap AP (1995) Characterization of the enhanced transport of L- and D-lactate into human red blood cells infected with Plasmodium falciparum suggests the presence of a novel saturable lactate proton cotransporter. *J Biol Chem* **270**: 15045–15052
- Czyzewski BK & Wang DN (2012) Identification and characterization of a bacterial hydrosulphide ion channel. *Nature* **483**: 494–497
- Das P, Lahiri A, Lahiri A & Chakravorty D (2009) Novel role of the nitrite transporter NirC in Salmonella pathogenesis: SPI2-dependent suppression of inducible nitric oxide synthase in activated macrophages. *Microbiology* **155**: 2476–2489
- DeCoursey TE & Cherny VV (1997) Deuterium isotope effects on permeation and gating of proton channels in rat alveolar epithelium. *J Gen Physiol* **109**: 415–434
- Delomenie C, Foti E, Floch E, Diderot V, Porquet D, Dupuy C & Bonaly J (2007) A new homolog of FocA transporters identified in cadmium-resistant Euglena gracilis. *Biochem Biophys Res Commun* **358**: 455–461
- Deuticke B (1982) Monocarboxylate transport in erythrocytes. *J Membr Biol* **70**: 89–103
- Diallinas G (2014) Understanding transporter specificity and the discrete appearance of channel-like gating domains in transporters. *Front Pharmacol* **5**: 207
- Dong X, Stothard P, Forsythe IJ & Wishart DS (2004) PlasMapper: a web server for drawing and auto-annotating plasmid maps. *Nucleic Acids Res* **32**: W660-4
- Drew D & Boulder O (2016) Shared molecular mechanisms of membrane transporters. *Annu Rev Biochem* **85**: 543-572

- Dutzler R (2007) A structural perspective on CIC channel and transporter function. *FEBS Lett* **581**: 2839–2844
- Dwyer JJ, Gittis AG, Karp DA, Lattman EE, Spencer DS, Stites WE & Garcia-Moreno EB (2000) High apparent dielectric constants in the interior of a protein reflect water penetration. *Biophys J* **79**: 1610–1620
- Elliott JL, Saliba KJ & Kirk K (2001) Transport of lactate and pyruvate in the intraerythrocytic malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Biochem J* **355**: 733–739
- Eraso P, Cid A & Serrano R (1987) Tight control of the amount of yeast plasma membrane ATPase during changes in growth conditions and gene dosage. *FEBS Lett* **224**: 193–197
- Falke D, Schulz K, Doberenz C, Beyer L, Lilie H, Thiemer B & Sawers RG (2010) Unexpected oligomeric structure of the FocA formate channel of *Escherichia coli*: A paradigm for the formate-nitrite transporter family of integral membrane proteins. *FEMS Microbiol Lett* **303**: 69–75
- Feng Z, Hou T & Li Y (2012) Concerted movement in pH-dependent gating of FocA from molecular dynamics simulations. *J Chem Inf Model* **52**: 2119–2131
- Fersht AR, Shi JP, Knill-Jones J, Lowe DM, Wilkinson AJ, Blow DM, Brick P, Carter P, Waye MM & Winter G (1985) Hydrogen bonding and biological specificity analysed by protein engineering. *Nature* **314**: 235–238
- Fitch CA, Karp DA, Lee KK, Stites WE, Lattman EE & Garcia-Moreno EB (2002) Experimental pK(a) values of buried residues: Analysis with continuum methods and role of water penetration. *Biophys J* **82**: 3289–3304
- Fukuda M, Takeda H, Kato HE, Doki S, Ito K, Maturana AD, Ishitani R & Nureki O (2015) Structural basis for dynamic mechanism of nitrate/nitrite antiport by NarK. *Nat Commun* **6**: 7097
- Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK & Weissman JS (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**: 737–741
- Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR & Woods RA (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**: 355–360
- Ginsburg H (2002) Abundant proton pumping in *Plasmodium falciparum*, but why? *Trends Parasitol* **18**: 483–486
- Golldack A, Henke B, Bergmann B, Wiechert M, Erler H, Blancke Soares A, Spielmann T & Beitz E (2017) Substrate-analogous inhibitors exert antimalarial action by targeting the *Plasmodium* lactate transporter PfFNT at nanomolar scale. *PLoS Pathog* **13**: e1006172

- Gordon-Beresford RM, van Belle D, Giraldo J & Wodak SJ (1996) Effect of nucleotide substrate binding on the pKa of catalytic residues in barnase. *Proteins* **25**: 180–194
- de Groote MA, Granger D, Xu Y, Campbell G, Prince R & Fang FC (1995) Genetic and redox determinants of nitric oxide cytotoxicity in a *Salmonella typhimurium* model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 6399–6403
- Hackette SL, Skye GE, Burton C & Segel IH (1970) Characterization of an ammonium transport system in filamentous fungi with methylammonium-¹⁴C as the substrate. *J Biol Chem* **245**: 4241–4250
- Halestrap AP (2012) The monocarboxylate transporter family - Structure and functional characterization. *IUBMB Life* **64**: 1–9
- Halestrap AP & Wilson MC (2012) The monocarboxylate transporter family - role and regulation. *IUBMB Life* **64**: 109–119
- Hapuarachchi SV, Cobbold SA, Shafik SH, Dennis ASM, McConville MJ, Martin RE, Kirk K & Lehane AM (2017) The Malaria Parasite's Lactate Transporter PfFNT Is the Target of Antiplasmodial Compounds Identified in Whole Cell Phenotypic Screens. *PLoS Pathog* **13**: e1006180
- Hausmann R, Gunther J, Kless A, Kuhlmann D, Kassack MU, Bahrenberg G, Markwardt F & Schmalzing G (2013) Salt bridge switching from Arg290/Glu167 to Arg290/ATP promotes the closed-to-open transition of the P2X2 receptor. *Mol Pharmacol* **83**: 73–84
- von Heijne G & Gavel Y (1988) Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur J Biochem* **174**: 671–678
- Hibbert F & Emsley J (1990) Hydrogen Bonding and Chemical Reactivity. *Adv Phys Org Chem* **26**: 255–379
- Ho MC, Menetret JF, Tsuruta H & Allen KN (2009) The origin of the electrostatic perturbation in acetoacetate decarboxylase. *Nature* **459**: 393–397
- Hohmann EL, Oletta CA, Loomis WP & Miller SI (1995) Macrophage-inducible expression of a model antigen in *Salmonella typhimurium* enhances immunogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 2904–2908
- Holm-Bertelsen J, Bock S, Helmstetter F & Beitz E (2016) High-level cell-free production of the malarial lactate transporter PfFNT as a basis for crystallization trials and directional transport studies. *Protein Expr Purif* **126**: 109–114

- Holmes AH, Moore LSP, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, Guerin PJ & Piddock LJV (2016) Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet* **387**: 176–187
- Hub JS & de Groot BL (2008) Mechanism of selectivity in aquaporins and aquaglyceroporins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 1198–1203
- Hunger D, Doberenz C & Sawers RG (2014) Identification of key residues in the formate channel FocA that control import and export of formate. *Biol Chem* **395**: 813–825
- Ishikita H & Knapp EW (2007) Protonation states of ammonia/ammonium in the hydrophobic pore of ammonia transporter protein AmtB. *J Am Chem Soc* **129**: 1210–1215
- Isom DG, Castaneda CA, Cannon BR & Garcia-Moreno B (2011) Large shifts in pKa values of lysine residues buried inside a protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 5260–5265
- Jacob F & Monod J (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* **3**: 318–356
- Javelle A, Lupo D, Ripoché P, Fulford T, Merrick M & Winkler FK (2008) Substrate binding, deprotonation, and selectivity at the periplasmic entrance of the Escherichia coli ammonia channel AmtB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 5040–5045
- Javelle A, Lupo D, Zheng L, Li XD, Winkler FK & Merrick M (2006) An unusual twin-his arrangement in the pore of ammonia channels is essential for substrate conductance. *J Biol Chem* **281**: 39492–39498
- Javelle A, Thomas G, Marini AM, Kramer R & Merrick M (2005) In vivo functional characterization of the Escherichia coli ammonium channel AmtB: evidence for metabolic coupling of AmtB to glutamine synthetase. *Biochem J* **390**: 215–222
- Jay AW (1975) Geometry of the human erythrocyte. I. Effect of albumin on cell geometry. *Biophys J* **15**: 205–222
- Jensen MD, Conley M & Helstowski LD (1983) Culture of Plasmodium falciparum: the role of pH, glucose, and lactate. *J Parasitol* **69**: 1060–1067
- Jentsch TJ, Poet M, Fuhrmann JC & Zdebik AA (2005) Physiological functions of CLC Cl⁻ channels gleaned from human genetic disease and mouse models. *Annu Rev Physiol* **67**: 779–807
- Jia W & Cole JA (2005) Nitrate and nitrite transport in Escherichia coli. *Biochem Soc Trans* **33**: 159–161

- Jia W, Tovell N, Clegg S, Trimmer M & Cole J (2009) A single channel for nitrate uptake, nitrite export and nitrite uptake by *Escherichia coli* NarU and a role for NirC in nitrite export and uptake. *Biochem J* **417**: 297–304
- Kabil O & Banerjee R (2010) Redox biochemistry of hydrogen sulfide. *J Biol Chem* **285**: 21903–21907
- Kanaani J & Ginsburg H (1991) Transport of lactate in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *J Cell Physiol* **149**: 469–476
- Khademi S, O'Connell J 3rd, Remis J, Robles-Colmenares Y, Miercke LJW & Stroud RM (2004) Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. *Science* **305**: 1587–1594
- Klis FM, de Koster CG & Brul S (2014) Cell wall-related biomarkers and bioestimates of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **13**: 2–9
- Knappe J & Sawers G (1990) A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **6**: 383–398
- Krishna S & Woodrow CJ (1999) Expression of parasite transporters in *Xenopus* oocytes. *Novartis Found Symp* **226**: 126–39
- Krishna S, Woodrow CJ, Burchmore RJ, Saliba KJ & Kirk K (2000) Hexose transport in asexual stages of *Plasmodium falciparum* and kinetoplastidae. *Parasitol Today* **16**: 516–521
- Laxminarayan R, Matsoso P, Pant S, Brower C, Rottingen J-A, Klugman K & Davies S (2016) Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. *Lancet* **387**: 168–175
- Leonhartsberger S, Korsa I & Bock A (2002) The molecular biology of formate metabolism in enterobacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**: 269–276
- Liu G, Hinch B, Davatol-Hag H, Lu Y, Powers M & Beavis AD (1996) Temperature dependence of the mitochondrial inner membrane anion channel. The relationship between temperature and inhibition by protons. *J Biol Chem* **271**: 19717–19723
- Longpre JP & Lapointe JY (2011) Determination of the Na⁽⁺⁾/glucose cotransporter (SGLT1) turnover rate using the ion-trap technique. *Biophys J* **100**: 52–59
- Lü W, Du J, Schwarzer NJ, Gerbig-Smentek E, Einsle O & Andrade SLA (2012a) The formate channel FocA exports the products of mixed-acid fermentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 13254–13259
- Lü W, Du J, Schwarzer NJ, Wacker T, Andrade SLA & Einsle O (2013) The formate/nitrite transporter family of anion channels. *Biol Chem* **394**: 715–727

- Lü W, Du J, Wacker T, Gerbig-Smentek E, Andrade SLA & Einsle O (2011) pH-dependent gating in a FocA formate channel. *Science* **332**: 352–354
- Lü W, Schwarzer NJ, Du J, Gerbig-Smentek E, Andrade SLA & Einsle O (2012b) Structural and functional characterization of the nitrite channel NirC from *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 18395–18400
- Ludewig U, von Wirén N & Frommer WB (2002) Uniport of NH₄⁺ by the root hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT1;1. *J Biol Chem* **277**: 13548–13555
- Lv X, Liu H, Ke M & Gong H (2013) Exploring the pH-dependent substrate transport mechanism of FocA using molecular dynamics simulation. *Biophys J* **105**: 2714–2723
- Maeda S-I, Murakami A, Ito H, Tanaka A & Omata T (2015) Functional Characterization of the FNT Family Nitrite Transporter of Marine Picocyanobacteria. *Life* **5**: 432–446
- Marchetti RV, Lehane AM, Shafik SH, Winterberg M, Martin RE & Kirk K (2015) A lactate and formate transporter in the intraerythrocytic malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun* **6**: 6721
- McIlvaine TC (1921) A buffer solution for colorimetric comparison. *J Biol Chem* **49**: 183–186
- McKee RW, Ormsbee RA, Anfinson CB, Geiman QM & Ball EG (1946) Studies on malarial parasites: VI. The chemistry and metabolism of normale and parasitized (*P. knowlesi*) monkey blood. *J Exp Med* **84**: 569–582
- McLaughlin SG & Dilger JP (1980) Transport of protons across membranes by weak acids. *Physiol Rev* **60**: 825–863
- Mertz EL & Krishtalik LI (2000) Low dielectric response in enzyme active site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 2081–2086
- Michaelis L & Menten M (1913) Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem Z* **1913**: 333–369
- Miller C (2006) CIC chloride channels viewed through a transporter lens. *Nature* **440**: 484–489
- Miller LH, Baruch DI, Marsh K & Doumbo OK (2002) The pathogenic basis of malaria. *Nature* **415**: 673–679
- Mollapour M & Piper PW (2007) Hog1 mitogen-activated protein kinase phosphorylation targets the yeast Fps1 aquaglyceroporin for endocytosis, thereby rendering cells resistant to acetic acid. *Mol Cell Biol* **27**: 6446–6456
- Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE & Lodish HF (1985) Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* **229**: 941–945

- Neuhauser B, Dynowski M & Ludewig U (2014) Switching substrate specificity of AMT/MEP/Rh proteins. *Channels* **8**: 496–502
- Nolling J & Reeve JN (1997) Growth- and substrate-dependent transcription of the formate dehydrogenase (fdhCAB) operon in *Methanobacterium thermoformicum* Z-245. *J Bacteriol* **179**: 899–908
- Paiva S, Devaux F, Barbosa S, Jacq C & Casal M (2004) Ady2p is essential for the acetate permease activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21**: 201–210
- Peakman T, Crouzet J, Mayaux JF, Busby S, Mohan S, Harborne N, Wootton J, Nicolson R & Cole J (1990) Nucleotide sequence, organisation and structural analysis of the products of genes in the nirB-cysG region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Eur J Biochem* **191**: 315–323
- Permyakov S, Suzina N & Valiakhmetov A (2012) Activation of H⁺-ATPase of the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* by glucose: The role of sphingolipid and lateral enzyme mobility. *PLoS One* **7**: e30966
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC & Ferrin TE (2004) UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**: 1605–1612
- Pfaller MA, Krogstad DJ, Parquette AR & Nguyen-Dinh P (1982) *Plasmodium falciparum*: stage-specific lactate production in synchronized cultures. *Exp Parasitol* **54**: 391–396
- Pinske C & Sawers RG (2016) Anaerobic Formate and Hydrogen Metabolism. *EcoSal Plus* **7**
- Poole RC & Halestrap AP (1994) N-terminal protein sequence analysis of the rabbit erythrocyte lactate transporter suggests identity with the cloned monocarboxylate transport protein MCT1. *Biochem J* **303**: 755–759
- Pusch M (2004) Structural insights into chloride and proton-mediated gating of CLC chloride channels. *Biochemistry* **43**: 1135–1144
- Rambow J, Wu B, Ronfeldt D & Beitz E (2014) Aquaporins with anion/monocarboxylate permeability: mechanisms, relevance for pathogen-host interactions. *Front Pharmacol* **5**: 199
- Reeve SM, Lombardo MN & Anderson AC (2015) Understanding the structural mechanisms of antibiotic resistance sets the platform for new discovery. *Future Microbiol* **10**: 1727–1733
- Rexach J, Fernandez E & Galvan A (2000) The *Chlamydomonas reinhardtii* Nar1 gene encodes a chloroplast membrane protein involved in nitrite transport. *Plant Cell* **12**: 1441–1453

- Rothert M, Ronfeldt D & Beitz E (2017) Electrostatic Attraction of Weak Monoacid Anions Increases Probability for Protonation and Passage through Aquaporins. *J Biol Chem* [Epub ahead of print]
- Ruetz S & Gros P (1994) Functional expression of P-glycoproteins in secretory vesicles. *J Biol Chem* **269**: 12277–12284
- Rycovska A, Hatahet L, Fendler K & Michel H (2012) The nitrite transport protein NirC from *Salmonella typhimurium* is a nitrite/proton antiporter. *Biochim Biophys Acta* **1818**: 1342–1350
- Rycovska-Blume A, Lü W, Andrade S, Fendler K & Einsle O (2015) Structural and Functional Studies of NirC from *Salmonella typhimurium*. *Methods Enzymol* **556**: 475–497
- Saier MH Jr., Eng BH, Fard S, Garg J, Haggerty DA, Hutchinson WJ, Jack DL, Lai EC, Liu HJ, Nusinew DP, Omar AM, Pao SS, Paulsen IT, Quan JA, Sliwinski M, Tseng TT, Wachi S & Young GB (1999) Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *Biochim Biophys Acta* **1422**: 1–56
- Sanger F, Nicklen S & Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463–5467
- Sarmini K & Kenndler E (1999) Ionization constants of weak acids and bases in organic solvents. *J Biochem Biophys Methods* **38**: 123–137
- Savage DF, O'Connell JD 3rd, Miercke LJW, Finer-Moore J & Stroud RM (2010) Structural context shapes the aquaporin selectivity filter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 17164–17169
- Sawers G (1994) The hydrogenases and formate dehydrogenases of *Escherichia coli*. *Antonie van Leeuwenhoek* **66**: 57–88
- Sawers G & Bock A (1988) Anaerobic regulation of pyruvate formate-lyase from *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **170**: 5330–5336
- Sawers RG (2006) Differential turnover of the multiple processed transcripts of the *Escherichia coli* *focA-pflB* operon. *Microbiology* **152**: 2197–2205
- Sawers RG & Clark DP (2004) Fermentative Pyruvate and Acetyl-Coenzyme A Metabolism. *EcoSal Plus* **1**
- Serrano R, Kielland-Brandt MC & Fink GR (1986) Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. *Nature* **319**: 689–693
- Sherman IW (1979) Biochemistry of *Plasmodium* (malarial parasites). *Microbiol Rev* **43**: 453–495
- Sherman IW (1998) Malaria: Parasite biology, pathogenesis, and protection. *Sondervan*

- Shiloh MU, MacMicking JD, Nicholson S, Brause JE, Potter S, Marino M, Fang F, Dinauer M & Nathan C (1999) Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity* **10**: 29–38
- Singer SJ (1990) The structure and insertion of integral proteins in membranes. *Annu Rev Cell Biol* **6**: 247–296
- Singer SJ & Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720–731
- Smart OS, Neduvellil JG, Wang X, Wallace BA & Sansom MS (1996) HOLE: A program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models. *J Mol Graph* **14**: 354–60
- Sols A & Crane RK (1954) Substrate specificity of brain hexokinase. *J Biol Chem* **210**: 581–595
- Soupene E, He L, Yan D & Kustu S (1998) Ammonia acquisition in enteric bacteria: physiological role of the ammonium/methylammonium transport B (AmtB) protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7030–7034
- Stephenson M & Stickland LH (1932) Hydrogenlyases: Bacterial enzymes liberating molecular hydrogen. *Biochem J* **26**: 712–724
- Stokes JL (1949) Fermentation of Glucose by suspensions of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **57**: 147–158
- Stroud RM, Nollert P & Miercke L (2003) The glycerol facilitator GlpF its aquaporin family of channels, and their selectivity. *Adv Protein Chem* **63**: 291–316
- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ & Dubendorff JW (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**: 60–89
- Suppmann B & Sawers G (1994) Isolation and characterization of hypophosphite-resistant mutants of *Escherichia coli*: identification of the FocA protein, encoded by the pfl operon, as a putative formate transporter. *Mol Microbiol* **11**: 965–982
- Tan KP, Nguyen TB, Patel S, Varadarajan R & Madhusudhan MS (2013) Depth: a web server to compute depth, cavity sizes, detect potential small-molecule ligand-binding cavities and predict the pKa of ionizable residues in proteins. *Nucleic Acids Res* **41**: W314–21
- Tan KP, Varadarajan R & Madhusudhan MS (2011) DEPTH: a web server to compute depth and predict small-molecule binding cavities in proteins. *Nucleic Acids Res* **39**: W242–8
- Thomas GH, Mullins JG & Merrick M (2000) Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters. *Mol Microbiol* **37**: 331–344

- Tsukaguchi H, Weremowicz S, Morton CC & Hediger MA (1999) Functional and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9. *Am J Physiol* **277**: F685-96
- Unkles SE, Symington VF, Kotur Z, Wang Y, Siddiqi MY, Kinghorn JR & Glass ADM (2011) Physiological and biochemical characterization of AnNitA, the *Aspergillus nidulans* high-affinity nitrite transporter. *Eukaryot Cell* **10**: 1724–1732
- Unwin N (1989) The structure of ion channels in membranes of excitable cells. *Neuron* **3**: 665–676
- van Dooren GG, Stimmler LM & McFadden GI (2006) Metabolic maps and functions of the *Plasmodium* mitochondrion. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 596–630
- Volkmer B & Heinemann M (2011) Condition-dependent cell volume and concentration of *Escherichia coli* to facilitate data conversion for systems biology modeling. *PLoS One* **6**: e23126
- Volkov V (2015) Quantitative description of ion transport via plasma membrane of yeast and small cells. *Front Plant Sci* **6**: 425
- Waight AB, Czyzewski BK & Wang DN (2013) Ion selectivity and gating mechanisms of FNT channels. *Curr Opin Struct Biol* **23**: 499–506
- Waight AB, Love J & Wang DN (2010) Structure and mechanism of a pentameric formate channel. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 31–37
- Walworth NC & Novick PJ (1987) Purification and characterization of constitutive secretory vesicles from yeast. *J Cell Biol* **105**: 163–174
- Walz T, Hirai T, Murata K, Heymann JB, Mitsuoka K, Fujiyoshi Y, Smith BL, Agre P & Engel A (1997) The three-dimensional structure of aquaporin-1. *Nature* **387**: 624–627
- Wang Y, Huang Y, Wang J, Cheng C, Huang W, Lu P, Xu YN, Wang P, Yan N & Shi Y (2009) Structure of the formate transporter FocA reveals a pentameric aquaporin-like channel. *Nature* **462**: 467–472
- Warshel A & Russell ST (1984) Calculations of electrostatic interactions in biological systems and in solutions. *Q Rev Biophys* **17**: 283–422
- White WB & Ferry JG (1992) Identification of formate dehydrogenase-specific mRNA species and nucleotide sequence of the fdhC gene of *Methanobacterium formicum*. *J Bacteriol* **174**: 4997–5004
- Wick AN, Drury DR, Nakada HI & Wolfe JB (1957) Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose. *J Biol Chem* **224**: 963–969

- Woodrow CJ, Penny JI & Krishna S (1999) Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* expresses a high affinity facilitative hexose transporter. *J Biol Chem* **274**: 7272–7277
- World Health Organization (2016) *World Malaria Report 2016*
- Wu B, Rambow J, Bock S, Holm-Bertelsen J, Wiechert M, Soares AB, Spielmann T & Beitz E (2015) Identity of a *Plasmodium* lactate/H(+) symporter structurally unrelated to human transporters. *Nat Commun* **6**: 6284
- Wu B, Steinbronn C, Alsterfjord M, Zeuthen T & Beitz E (2009) Concerted action of two cation filters in the aquaporin water channel. *EMBO J* **28**: 2188–2194
- Yan H, Huang W, Yan C, Gong X, Jiang S, Zhao Y, Wang J & Shi Y (2013) Structure and mechanism of a nitrate transporter. *Cell Rep* **3**: 716–723
- Yan N (2015) Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters. *Annu Rev Biophys* **44**: 257–283
- Zheng L, Kostrewa D, Berneche S, Winkler FK & Li XD (2004) The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 17090–17095

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation, abgesehen von der Beratung durch den Betreuer, selbstständig verfasst habe und keine weiteren Quellen und Hilfsmittel als die hier angegebenen verwendet habe. Diese Arbeit hat weder ganz, noch in Teilen, bereits an anderer Stelle einer Prüfungskommission zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegen.

Ein Teil dieser Arbeit wurde unter dem folgenden Titel publiziert:

Wiechert M, Erler H, Gollmack A, Beitz E (2017) A widened substrate selectivity filter of eukaryotic formate-nitrite transporters enables high-level lactate conductance. *FEBS J* [im Druck]

Wiechert M, Beitz E (2017) Formate-nitrite transporters: monoacids ride the dielectric slide. *Channels* [im Druck]

Wiechert M, Beitz E (2017) Mechanism of formate-nitrite transporters by dielectric shift of substrate acidity. *EMBO J* **36**: 949-958.

Gollmack A, Henke B, Bergmann B, Wiechert M, Erler H, Blancke Soares A, Spielmann T, Beitz E (2017) Substrate-analogous inhibitors exert antimalarial action by targeting the Plasmodium lactate transporter PfFNT at nanomolar scale. *PLoS Pathog* **13**: e1006172.

Ich erkläre, dass die vorliegende Arbeit gemäß der Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft erstellt wurde.

Marie Wiechert

Kiel, Juni 2017

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Marie Inken Wiechert
Geburtsdatum	27. Februar 1989
Geburtsort	Bad Belzig
Nationalität	Deutsch

Promotion, Weiterbildung

seit 04/2014	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Promotion zum Thema „Transportmechanismus und Selektivität von Formiat-Nitrit-Transportern“ unter Leitung von Prof. Dr. Eric Beitz
seit 04/2014	Weiterbildung zum Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik

Studium der Pharmazie und Ausbildung zur Apothekerin

01/2014	Approbation als Apothekerin
07/2013–12/2013	Pharmazeutin im Praktikum, Feen-Apotheke, Hamburg
12/2012–05/2013	Pharmazeutin im Praktikum, Pharmazeutisches Institut, Arbeitskreis Prof. Dr. Eric Beitz, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel
10/2008–11/2012	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel

Schulbildung

06/2008	Allgemeine Hochschulreife, Gymnasium Marienschule, Hildesheim
---------	---

Publikationen

Wiechert M, Erler H, Gollmack A, Beitz E (2017) A widened substrate selectivity filter of eukaryotic formate-nitrite transporters enables high-level lactate conductance. *FEBS J* [im Druck]

Wiechert M, Beitz E (2017) Formate-nitrite transporters: monoacids ride the dielectric slide. *Channels* [im Druck]

Wiechert M, Beitz E (2017) Mechanism of formate-nitrite transporters by dielectric shift of substrate acidity. *EMBO J* **36**: 949-958.

Gollmack A, Henke B, Bergmann B, Wiechert M, Erler H, Blancke Soares A, Spielmann T, Beitz E (2017) Substrate-analogous inhibitors exert antimalarial action by targeting the Plasmodium lactate transporter PffNT at nanomolar scale. *PLoS Pathog* **13**: e1006172.

Wu B, Rambow J, Bock S, Holm-Bertelsen J, Wiechert M, Blancke Soares A, Spielmann T, Beitz E (2015) Identity of a Plasmodium lactate/H⁺ symporter structurally unrelated to human transporters. *Nat Commun* **6**: 6284.

Vorträge

Vortrag „*Mechanism of formate-nitrite transporters*“ auf der DPhG Tagung *Frontiers in Medicinal Chemistry* (Satellite Meeting) in Bern (CH), Februar 2017

Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist unter der Leitung von Prof. Dr. Eric Beitz am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel entstanden. Ihm danke ich für dieses spannende Thema, mit dem ich mich in den letzten Jahren beschäftigen durfte. Außerdem danke ich ihm sehr für seine große Unterstützung und Förderung sowie die vertrauensvolle Zusammenarbeit.

Bei Uli Girreser möchte ich mich für die Zusammenarbeit im Praktikum des 4. Semesters bedanken, in dem er mich immer unterstützt hat, z.B. wenn mal wieder eine der HPLCs kaputt war. Aber auch sonst schätze ich sein Organisationstalent und vor allem das Engagement für die Mitarbeiter, seine Arbeit bereichert dieses Institut. Auch Monja, Julia, Folkhard, Philipp & Malte danke ich für die nette Zusammenarbeit während des Praktikums.

Kalle danke ich für seine heldenhaften Noteinsätze bei diversen Gerätedefekten und seine unermüdliche gute Laune. Björn danke ich für seine unendliche Hilfsbereitschaft, das Einarbeiten in das Sequenziergerät und natürlich die diversen Sequenzierungen meiner „Pu-Mu“s“. Anna, Manu, Dina, Susan und unseren Hilfswissenschaftlern danke ich dafür, dass sie uns Doktoranden im Laboralltag immer unterstützt und die Arbeit erleichtert haben. Bei Susanne möchte ich mich für ihre unglaublich herzliche Art und die Organisation dieses Instituts bedanken. Volkmar und Detlef möchte ich mich für ihre vielen Rettungseinsätze bei IT-Problemen danken.

Janis danke ich für das Einarbeiten in das Isotopenlabor & Christoph Gelhaus für die nette Zusammenarbeit und das Beantworten jeglicher Fragen zum Strahlenschutz. Julia von Bülow möchte ich für ihre große Hilfsbereitschaft und gute Laune Danke sagen – ihre Begeisterung für die Wissenschaft war stets motivierend und ansteckend.

Ich danke André, Holger, Tine, Alexandra und meiner Mama für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Auch Sophie danke ich dafür, dass sie noch in letzter Minute mein Abstract korrigiert hat.

Die Zeit im „Mädelsbüro“ mit Tine, Monja und Julia HB werde ich nie vergessen! Die gemeinsame Zusammenarbeit im Laboralltag hat dafür gesorgt, dass ich jeden Tag sehr gerne ins Institut gekommen bin. Monja und Tine danke ich außerdem für die Zeit im Schreibbüro, welche durch euch wesentlich angenehmer geworden ist.

Philipp danke ich für die schönen Gespräche über Kaffee, Kulinarik und manchmal auch fachlicher Natur in unseren Kaffeepausen bei Loppo oder im Sozialraum. Auch Folknand danke ich für die vielen schönen Gespräche und die Zusammenarbeit.

Tine, Monja, Julia HB, Julia vB, Folknand, Philipp, André, Holger, Alex, Ahmad, Tamara, Franzi, Anna, Kalle, Malte, Jenny und allen weiteren Gästen der Mittagsrunde danke ich für die vielen lustigen Gespräche und die angenehmen Pausen!

Meinem Arbeitskreis danke ich für die schöne Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima. Auch allen weiteren Mitarbeitern dieses Instituts möchte ich für die nette Atmosphäre im Arbeitsalltag danken.

Den beiden Julias, Monja, Tine, André, Philipp und Folknand danke ich für die schönen Momente, die wir auch außerhalb dieses Instituts verbracht haben und welche die Zeit für mich unvergesslich machen werden.

Florian, dir danke ich für deine große Unterstützung und den Rückhalt während der Promotion und allen weiteren Lebenslagen. Dir habe ich viele gestalterische Elemente dieser Arbeit zu verdanken und du hast mich vor allem auf den letzten Metern immer wieder motiviert und mir Mut gemacht.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und vor allem meinen Eltern. Ohne euch wäre dieser Weg für mich nicht möglich gewesen. Ihr habt mir immer mit Rat und Tat in jeder Situation beiseite gestanden und habt alles erdenklich Machbare getan, um mir zu helfen. Ich kann einfach nicht in Worte fassen, wie sehr ich euch für eure bedingungslose Unterstützung und Liebe dankbar bin!