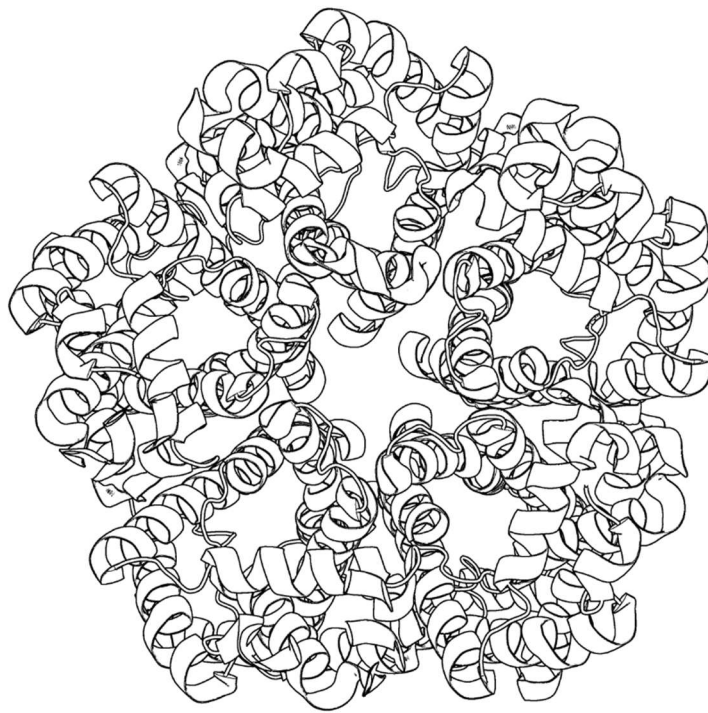


Untersuchung der Abhängigkeit der Funktionalität von Formiat-Nitrit- Transportern vom zentralen Histidin



Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Folkhard Helmstetter
Kiel 2019

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Eric Beitz

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. med. Markus Bleich

Tag der Mündlichen Prüfung:

15. Februar 2019

Zum Druck genehmigt:

15. Februar 2019

Für meine Familie,
Freunde und all die lieben Menschen,
die mir auf meinem Weg geholfen haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Formiat-Nitrit-Transporter (FNT).....	7
1.1.1	Die physiologische Rolle von Formiat-Nitrit-Transportern	7
1.1.2	Struktureller Aufbau von FNTs	8
1.1.3	Der ϕ /K-Selektivitätsfilter von FNTs	11
1.1.4	Transportmechanismus der FNTs	12
1.1.5	Die Rolle des zentralen Histidins in FNTs	18
1.1.6	Direktionalität von FNTs.....	21
1.1.7	Der Formiat-Nitrit-Transporter in <i>Entamoeba histolytica</i> EhFNT	22
1.1.8	Der Formiat-Nitrit-Transporter in <i>Bacillus thuringiensis</i> BtFdhC.....	23
1.2	Zielsetzung der Arbeit.....	25
2	Material.....	26
2.1	Enzyme, Chemikalien, Kits, Material	26
2.2	Geräte	29
2.3	Plasmide.....	31
2.4	Kodierende DNA-Sequenzen	33
2.5	Oligonukleotide (primer)	33
2.6	<i>E. coli</i> -Stämme	33
2.7	<i>S. cerevisiae</i> -Stämme.....	33
2.8	Antikörper.....	34
2.9	Puffer, Medien und Lösungen	34
2.9.1	Molekularbiologie	34
2.9.2	Proteinchemie	36
2.9.3	¹⁴ C-Substrataufnahmeassay	37
2.9.4	Zellfreie Proteinherstellung.....	38
2.9.5	Liposomen	39
3	Methoden	40
3.1	Molekularbiologische Methoden	40
3.1.1	Agarose-Gel-Elektrophorese	40
3.1.2	DNA-Isolierung aus Agarosegelen.....	41
3.1.3	DNA-Plasmid-Isolierung aus Bakterien	41

Inhaltsverzeichnis

3.1.4	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	41
3.1.5	Restriktionsverdau	41
3.1.6	Ligation	42
3.1.7	Transformation von <i>E. coli</i>	42
3.1.8	Schnelltransformation von <i>E. coli</i>	42
3.1.9	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	42
3.1.10	Isolierung von sekretorischen Vesikeln aus NY17- <i>S. cerevisiae</i>	43
3.1.11	Dauerkulturen von <i>E. coli</i>	43
3.1.12	Dauerkulturen von <i>S. cerevisiae</i>	43
3.1.13	DNA-Sequenzierung	43
3.1.14	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	44
3.2	Proteinchemische Methoden	44
3.2.1	Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus <i>S. cerevisiae</i>	44
3.2.2	Proteinquantifizierung	45
3.2.3	<i>Sodium dodecylsulfate</i> -Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
3.2.4	Polyacrylamid-Gelfärbung mit Coomassie	46
3.2.5	Western Blot.....	46
3.3	Zellfreie Proteinherstellung.....	46
3.3.1	Gewinnung eines S30-Extrakts aus <i>E. coli</i>	47
3.3.2	Gewinnung von T7-RNA Polymerase	48
3.3.3	Analytischer Ansatz zellfreier Proteinherstellung.....	49
3.3.4	Präparativer Ansatz zellfreier Proteinherstellung.....	51
3.3.5	Bestimmung der Fluoreszenzintensität von GFP und GFP-Fusionsproteinen ...	53
3.3.6	Proteinfällung mit Trichloressigsäure	53
3.3.7	Reinigung zellfrei hergestellter Membranproteine	53
3.3.8	Proteinkonzentrierung	55
3.3.9	Transmissionselektronenmikroskopie von Proteinen.....	55
3.4	Proteoliposomen	56
3.4.1	Präparation von Proteoliposomen und Leerliposomen.....	56
3.4.2	Beladung von Liposomen mit pH-sensitiven Fluorophoren.....	57
3.4.3	Untersuchungen von Liposomen	63
3.5	Aufnahme-Assay mit ¹⁴ C-markierten Substraten an <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	72

Inhaltsverzeichnis

4	Ergebnisse	73
4.1	FNT-Expression in <i>S. cerevisiae</i> und ¹⁴ C-markierte Substrataufnahme	73
4.2	Zellfreie Herstellung von <i>EhFNT</i> , <i>BtFdhC1</i> und anderer FNTs.....	75
4.2.1	Herstellung und Qualität der S30-Extrakte	75
4.2.2	Herstellung und Qualität der T7-RNA-Polymerase	77
4.2.3	Detergenzien-Screening für die zellfreie Proteinherstellung.....	77
4.2.4	Reinigungsdetergenzien-Screening	79
4.2.5	Zellfreie präparative Herstellung von FNTs.....	82
4.2.6	Transmissionselektronenmikroskopie von FNTs in Brij® 78-Mizellen.....	82
4.3	Qualitätskontrolle von Proteoliposomen	84
4.3.1	Kontrolle der Liposomengröße	84
4.3.2	Kontrolle der FNT-Rekonstitution Liposomen	86
4.3.3	Orientierung von <i>EhFNT</i> in Proteoliposomen	86
4.4	Untersuchung der Funktion von FNTs ohne zentrales Histidin.....	89
4.4.1	Funktionsnachweis von <i>EhFNT</i> und <i>BtFdhC1</i> mit Formiat-Gradienten	89
4.4.2	Untersuchung der Substratselektivität von <i>EhFNT</i> und <i>BtFdhC1</i>	90
4.4.3	Untersuchung der Affinität und Transportkapazität von <i>EhFNT</i>	94
4.4.4	Untersuchung der Funktionsweise von FNTs ohne zentrales Histidin.....	95
4.5	Untersuchung der Direktionalität von FNTs.....	106
4.5.1	Herstellung von <i>PfFNT</i> -haltigen Vesikeln aus NY17 <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	106
4.6	Methodenoptimierung: Liposomenherstellung und Dichtigkeit	108
4.6.1	Einfluss DMSO auf Durchlässigkeit von Liposomen	108
4.6.2	Einfluss von FNTs auf Wasser-Durchlässigkeit von Liposomen	109
4.6.3	Protonen-Dichtigkeit von Liposomen	111
4.6.4	Einfluss der Detergenzkonzentration auf die FNT-Rekonstitution	113
5	Diskussion	115
5.1	Methodenoptimierung	115
5.1.1	FNTs ohne zentrales Histidin sind in Hefezellen nicht funktionell.....	115
5.1.2	<i>EhFNT</i> -Proteingröße und Multimer-Stabilität.....	115
5.1.3	Optimierung der Proteoliposomenherstellung.....	116
5.1.4	Vergleichbarkeit der ermittelten Daten mit anderen Systemen	117
5.1.5	Einfluss des chemischen Gradienten auf normierte Streulichtkurven	119

Inhaltsverzeichnis

5.2	Klärung des Funktionsmechanismus von FNTs	119
5.2.1	Transport der FNTs ohne zentrales Histidin ist protonengradientenabhängig	119
5.2.2	Transportkapazität von <i>Eh</i> FNT-Liposomen ist protonengradientenabhängig.	120
5.2.3	Unterschiedliche Substratselektivität aufgrund des ϕ /K-Selektivitätsfilters ..	121
5.2.4	FNTs ohne zentrales Histidin zeigen niedrige, FNT-typische Substrataffinität	122
5.2.5	Funktion der polaren Aminosäuren im Transportpfad von FNTs	122
5.2.6	Nachweis von Proton-Substrat-Symport durch FNTs mit Fluorophoren	123
5.2.7	<i>Pf</i> FNT transportiert bidirektional und pH-abhängig	125
5.3	Pharmazeutische Relevanz	127
5.3.1	<i>Eh</i> FNT als <i>drug target</i>	127
5.3.2	<i>Bt</i> FdhC als <i>drug target</i>	130
5.4	Ausblick	131
6	Zusammenfassung	133
7	Summary	134
8	Literaturverzeichnis	135
9	Anhang	145
	Eidesstattliche Erklärung	149
	Danksagung	150

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
ACMA	9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridin
<i>Aqua bidest.</i>	gereinigtes Wasser
as	<i>antisense</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CCCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
CECF	<i>continuous exchange cell-free</i> (kontinuierliche Zellfreie Proteinherstellung)
cpm	<i>counts per minute</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribunucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNP	2,4-Dinitrophenol
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FdhC	<i>Formate dehydrogenase Channel</i>
FNT	Formiat-Nitrit-Transporter
FocA	<i>Formate channel A</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein aus <i>Aequorea victoria</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hämagglutinin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HSC	<i>Hydrosulfide channel</i>
LB	<i>lysogeny broth</i> (Nährmedium zur Aufzucht von <i>E. coli</i>)
MCT	Monocarboxylat-Transporter
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MTBST	<i>TRIS-buffered saline</i> mit Tween 20 [®] und Milchpulver
Ni-NTA	Nickel ²⁺ -Nitrilotriessigsäure
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Polyacrylamidgelelektrophorese)
PEG	Polyethylenglykol
psi	<i>pound-force per square inch</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RWCMDE	Aminosäure-Mix aus Arginin, Tryptophan, Cystein, Methionin, Aspartat und Glutamat
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
S.E.M.	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler)

Abkürzungsverzeichnis

SD-Medium	Synthetisches Dextrose-Minimalmedium zur Selektion von transformierten <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Zellen
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumlaurylsulfat
TBS	<i>TRIS-buffered saline</i>
TBST	<i>TRIS-buffered saline</i> mit Tween® 20
TCA	Trichloressigsäure
TEM	<i>transmission electron microscopy</i> (Transmissionselektronenmikroskopie)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembranspanne
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>units</i>
U min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
YPD	<i>yeast extract peptone dextrose</i> , reichhaltiges Nährmedium zur Aufzucht von untransformierten <i>S. cerevisiae</i>
YTPG	<i>yeast trypton phosphate glucose</i> , Medium für die <i>E.coli</i> -Fermentation

1 Einleitung

In jedem Organismus stellen lipophile Biomembranen für geladene Moleküle eine nahezu unüberwindbare energetische Barriere dar. In diese Lipiddoppelschichten integrierte Membranproteine ermöglichen den Transport der Ionen. In vielen Organismen übernehmen Formiat-Nitrit-Transporter (FNT) die Transportfunktion für Anionen monovalenter Säuren wie zum Beispiel Formiat, Acetat und Laktat. Für die Funktionsweise dieser Membranproteine wurden seit ihrer Entdeckung in den 1990er Jahren auf Grundlage experimenteller und bioinformatischer Daten verschiedene Theorien postuliert und diskutiert (1–3). Die Theorien erklären den Funktionsmechanismus dabei mit verschiedenen Eigenschaften der FNTs. Während eine Gruppe behauptet, ein in allen bisher untersuchten FNTs existentes zentrales Histidin sei für die Funktion unerlässlich (1, 2), kann das Modell der anderen Gruppe den FNT-vermittelten Substrattransport auch für die kleine Gruppe von FNTs ohne dieses zentrale Histidin erklären (3).

1.1 Formiat-Nitrit-Transporter (FNT)

Formiat-Nitrit-Transporter sind wichtige Transportproteine im Metabolismus von niederen, einzelligen Organismen wie Bakterien, Algen, Pilzen, Apikomplexa und Amöben (4), wo sie mit geringer Selektivität den Transport der Anionen einfacher monovalenter Säuren wie Formiat, Acetat, L-Laktat, Hydrogensulfid und Nitrit über Membranen ermöglichen (1, 5).

1.1.1 Die physiologische Rolle von Formiat-Nitrit-Transportern

Während der Energiegewinnung durch Abbau von aufgenommenen Substraten wie Glukose entstehen innerhalb der Zellen bei Redoxreaktionen metabolische Endprodukte, die herausbefördert werden müssen. Unter anaeroben Bedingungen produzieren Bakterien beispielsweise Formiat, Nitrit oder Hydrosulfid, welche bei Anreicherung im Zytosol toxisch wirken (6–8). Daher ist unter diesen Bedingungen der Transport solcher Moleküle aus der Zelle ins umgebende Medium essenziell für ihre Vitalität. Erste Vorhersagen, dass FNTs diese Rolle einnehmen könnten, wurden bereits in den 1990er Jahren gemacht aufgrund der Co-Lokation der DNA-Sequenzen potentieller Membranproteine mit im Redoxstoffwechsel beteiligten Enzymen auf identischen DNA-Abschnitten (Operons) (9). Man nennt diese Transporter-Familie bis heute Formiat-Nitrit-Transporter (FNT, *transporter-classification-ID* 1.A.16 (10, 11)), obwohl sie ein sehr breites Transportspektrum aufweisen und zum Beispiel auch Monocarboxylate wie Acetat und L-Laktat transportieren können (12, 1, 13, 5, 14–16). FNTs sind neben dem Kohlenhydrat- auch im Stickstoff- und Schwefel-Kreislauf involviert. Die zuerst entdeckten Prototyp-FNT-Proteine FocA und seine Orthologe FdhC, NirC und HSC bilden neben den bisher unerforschten YfdC-Proteinen die fünf Subfamilien der FNT-Transporter (17), denen unterschiedliche, wichtige Transport-Funktionen im Metabolismus zukommen.

Beim anaeroben Metabolismus von *E. coli* entstehen während der gemischten Säure-Gärung von Glukose Acetyl-CoA und Formiat als Endprodukte (18). Eine Assimilation von Formiat führt intrazellulär zu zelltoxischer Azidifizierung, weshalb der Export des Formiat-Anions für *E. coli*-Zellen unter diesen Bedingungen lebenswichtig ist.

Auch in Eukaryoten sind Formiat-Nitrit Transporter entdeckt und charakterisiert worden. Unsere Arbeitsgruppe beschrieb 2015 zeitgleich mit der Gruppe von Kieran Kirk den FNT des Erregers der Malaria tropica (*Plasmodium falciparum*), genannt PffNT (15, 4). Dieser ist für den Erreger von zentraler Bedeutung. Der Erreger befällt menschliche Erythrozyten und ernährt sich von der Glukose der Wirtszelle, die er nach Aufnahme über den Hexosetransporter HT1 zu Laktat metabolisiert (19). Ähnlich wie Formiat in Bakterien führt Laktat bei Anreicherung in Plasmodien-Zellen zu einer toxischen Azidifizierung des Zytosols. Den Laktat-Export vermittelt PffNT. Diesen beiden Arbeitsgruppen gelang es unabhängig voneinander, ein kleines Molekül (MMV007389) als PffNT-Inhibitor zu identifizieren und charakterisieren (20, 21). MMV007389 tötet *P. falciparum*-Kulturen in nanomolaren Konzentrationen ab und stellt somit eine Ausgangssubstanz für eine gezielte Wirkstoffsynthese dar.

1.1.2 Struktureller Aufbau von FNTs

Es wurden bis heute fünf verschiedene FNTs erfolgreich kristallisiert und mittels Röntgenkristallographie dreidimensionale Strukturen mit Auflösungen im Å-Bereich erzeugt (5, 13, 22–24). Die in dieser Arbeit dargestellten Modelle noch nicht kristallisierter FNTs wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit Swissmodel® basierend auf dem von Lü *et al.* publizierten FocA aus *Salmonella typhimurium* (23) als Vorlage (PDB #3Q7K) erstellt (25–28).

Die Daten der fünf hoch aufgelösten FNT-Kristallstrukturen ermöglichten es, verschiedene Merkmale der räumlichen Anordnung der FNTs abzuleiten. FNTs bilden Homopentamere mit einem Durchmesser von ca. 80 Å und einer Höhe von ca. 50 Å (5, 29) (Abbildung 1.1). Die einzelnen Protomere sind dabei symmetrisch und scheibenförmig um eine zentrale, hydrophobe Pore angeordnet. Diese dient dabei nicht dem Substrattransport, sondern ist im natürlichen Zustand mit Phospholipiden gefüllt (5). Die identische Faltung von FNTs und Aquaporinen (30, 31, 5) lässt sich weder auf Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz, noch in der von ihnen erfüllten Wassertransportfunktion zurückführen und stellt eine strukturelle Mimikry dar (32).

Einleitung

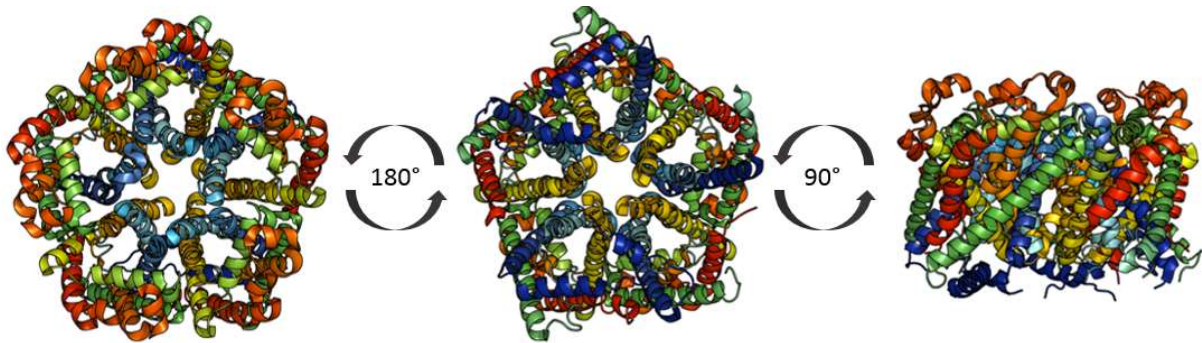


Abbildung 1.1: Pentamer von FocA aus *Salmonella typhimurium* (StFocA, PDB #3Q7K). Sicht von extrazellulärer und intrazellulärer Seite sowie Seitenansicht durch die Membranebene (von links nach rechts). Die einzelnen Helices jeder Untereinheit sind in verschiedenen Farben dargestellt. Abbildung erstellt mit Pymol® Molecular Graphics System.

Jedes Protomer besitzt sechs α -helikale Transmembranspannen (TM1-6) und ist so orientiert, dass die polaren Termini ins Zytosol ragen (Abbildung 1.2). Sie folgen der „positive inside“-Regel des sekretorischen Proteineinbaus in Membranen (33, 34). Die Transmembranspannen 2 (TM2) und 5 (TM5) heben sich von den anderen ab, da sie aus zwei Halbhelices bestehen. Die TM2 wird aus den Halbhelices TM2A und TM2B, die TM5 wird aus den Halbhelices TM5A und TM5B gebildet. Die beiden Halbhelices sind jeweils durch sogenannte *loop*-Regionen verbunden. In TM2 wird der *loop* als L2 (Ω -*loop*) und in TM5 als L5 (*S-loop*) bezeichnet (22). Diese beiden *loops* bilden zwei lipophile Engstellen, die eine lipophile Kavität umschließen, wobei L2 die intrazelluläre und L5 die extrazelluläre Seite begrenzt (Abbildung 1.3). Diese Kavität erstreckt sich im Prototyp-FNT *EcFocA* über 7,5 Å und weist an ihrer extrazellulären Seite eine ca. 1,8 Å und an der zytosolischen Seite eine ca. 1,35 Å große Öffnung auf (5). Diese stellen den Übergang zu schlauch- oder trichterartigen Strukturen größerer Durchmesser dar, die in die Räume unter- und oberhalb der Membran münden. Die Aminosäuresequenzen in dieser kanalartigen Struktur liegen dabei hochkonserviert vor (5, 17) und bilden den Transportpfad für die Substrate (3, 1). Die Beweglichkeit der Aminosäureseitenketten in den Engstellen ermöglicht eine Änderung des Engstellendurchmessers, sogenanntes *flickering*. Dadurch ist der Substrattransport möglich, wobei die kleinsten FNT-Substrate Formiatmoleküle sind, die an der schmalsten Stelle eine Breite von 3,7 Å aufweisen und daher ohne *flickering* FNTs nicht überqueren könnten (35, 22). Innerhalb des zentralen lipophilen Hohlraums der FNTs befindet sich ein stark konserviertes Histidin, das über eine Wasserstoffbrückenbindung in Kontakt zu einem fixierten Wassermolekül steht. Dieses ist außerdem von einem ebenfalls konservierten Threonin über Wasserstoffbrücken gebunden (5).

Einleitung

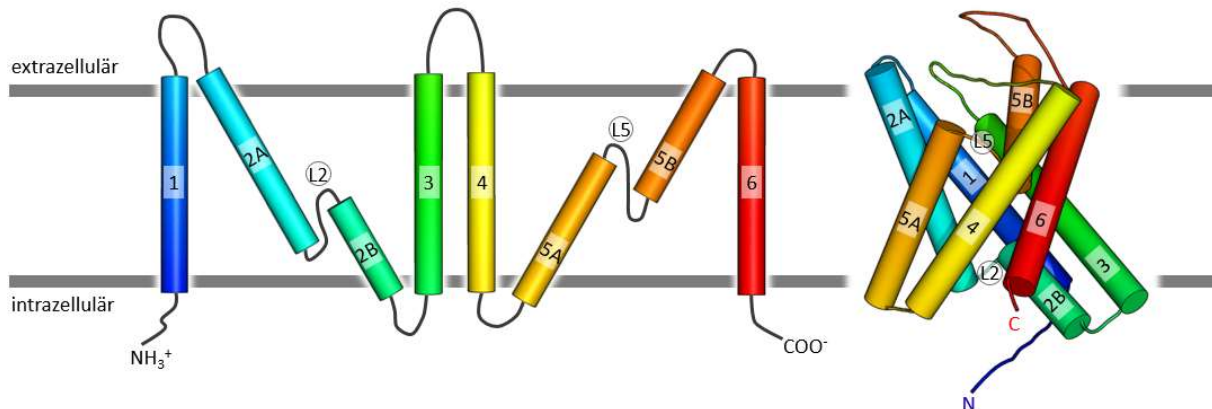


Abbildung 1.2: Topologie eines FNT-Protopomers in der Seitenansicht in der Membranebene. Links ist die schematische Darstellung mit gut erkennbarer Spiegelebene, rechts die Tertiärstruktur von StFocA (PDB #3Q7K) dargestellt. Die α -Helices der Transmembran-spannen sind als Zylinder dargestellt (Rechtecke, TM1-6). N- und C-Terminus ragen ins Zytosol. Die beiden loop-Regionen L5 und L2 (Kreise) bilden zwei Engstellen im Transportpfad, was zur Ausbildung eines lipophilen Hohlraums führt. Abbildung erstellt mit Pymol® Molecular Graphics System.

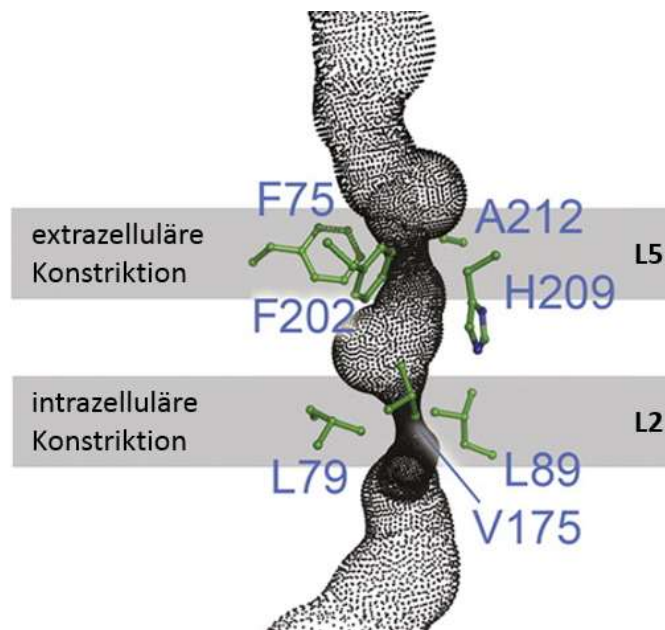


Abbildung 1.3: Seitenansicht des Substrattransportpfades (gepunktet) von StFocA (PDB #3Q7K), unten intrazelluläre und oben extrazelluläre Seite. Die zentrale Kavität wird durch die loops L2 und L5 gebildeten Konstriktionen unten und oben begrenzt. Die beteiligten, konservierten Aminosäuren schirmen ein Histidin ab, dass in die lipophile Kavität ragt. Durchmesser des Transportpfades berechnet mit HOLE® (36), Abbildung übernommen von Lü et al. (35).

1.1.3 Der ϕ /K-Selektivitätsfilter von FNTs

Da FNTs in einer Vielzahl von Organismen verschiedene Anionen kleiner, einfacher Säuren transportieren, benötigen sie einen Selektivitätsfilter. Die Substrate unterscheiden sich dabei in ihrer Größe als auch in ihrer Azidität. Die lipophilen Engstellen kommen aufgrund der beobachteten Beweglichkeit dafür nicht in Frage (35), sie dienen den FNTs vorwiegend zur Erzeugung energetischer Barrieren gegen die Passage geladener Teilchen (37). Durch Arbeiten unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass die Selektivität der FNTs für bestimmte Substrate durch eine Filterregion oberhalb der extrazellulären Konstriktion, genannt ϕ /K-Selektivitätsfilter, bedingt wird (16). Dieser selektiert die Substrate nach ihrer Größe (Abbildung 1.4). Er ist entsprechend seiner physiologischen Funktionen bei Prokaryoten enger als bei Eukaryoten. Der plasmodiale FNT *PfFNT* kann zum Beispiel L-Laktat transportieren, *FocA* aus *E. coli* (*EcFocA*) ist dazu nicht in der Lage (Abbildung 1.4 A oben). Betrachtet man die 3D-Modelle dieser beiden Transporter im Querschnitt (Abbildung 1.4 A unten), fällt zudem auf, dass die FNT-Öffnung zum Extrazellulärraum beim Eukaryoten trichterförmig und beim Prokaryoten eher flaschenhalsartig ist, was eine Anpassung für den Transport größerer Moleküle durch eukaryotische FNTs darstellt.

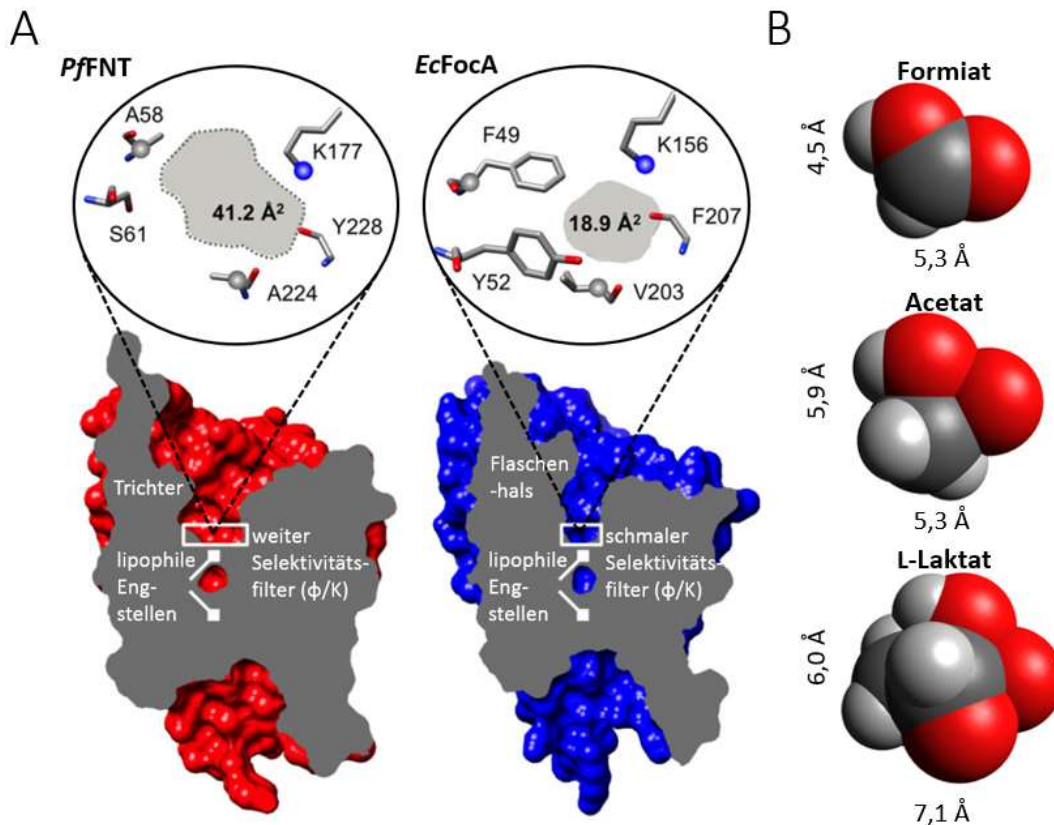


Abbildung 1.4: (A) Selektivitätsfilter und dreidimensionale Struktur eines eukaryotischen FNTs (*PffFNT*, links, Modell basierend auf *EcFocA* (PDB #3KCU), mit SWISSMODEL® erstellt) und eines prokaryotischen FNTs (*EcFocA*, rechts, PDB #3KCU). Oben: φ/K-Selektivitätsfilter in extrazellulärer Aufsicht mit grau gefärbter Querschnittsfläche der Selektivitätsfilter, welche bei *PffFNT* größer ist als bei *EcFocA*. Die Darstellung und Kalkulation der Oberfläche erfolgte mit Chimera®. Unten: Die Seitensicht in Membranebene auf die beiden Proteine lassen bei *PffFNT* einen trichterförmigen extrazellulären Eingangsbereich erkennen, während *EcFocA* an selber Stelle eine flaschenhalsartige Form aufweist. Die Proteinstrukturen wurden mit Pymol® Molecular Graphics System erstellt. Abbildung übernommen und modifiziert aus (16). (B) Van-der-Waals Modelle einiger Monocarboxylate, die durch FNTs transportiert werden. Abbildung erstellt mit Avogadro® Chemistry 2018.

1.1.4 Transportmechanismus der FNTs

Ein Proton-Substrat-Symport-Mechanismus für FNTs wurde bereits in den 1990er Jahren von Suppmann und Sawers vorgeschlagen (12). Spätere elektrophysiologische und kristallographische Untersuchungen legten eher eine Funktionsweise als Anionenkanal nahe (5, 23, 24). Dabei bestimmten unter anderem Lü *et al.* in verschiedenen Versuchen die Substratleitfähigkeit von FNTs für Formiat, Acetat, Pyruvat, Laktat, Nitrit, Nitrat, Hypophosphit und Chlorid, deren Affinitäten im hohen millimolaren Bereich lagen. Die geringen Affinitäten und das breite Substratspektrum für kleine monovalente Anionen belegen die kanalartigen Eigenschaften der FNTs. Auch die Struktur der FNTs und ihre strukturelle Ähnlichkeit zu den Aquaporinen sind Kennzeichen von Kanälen (5, 22). Aufgrund der bei *StFocA* beobachteten Auffälligkeiten der Kristallstrukturen bei sauren pH-Bedingungen (pH 4,0) und des ebenfalls

im Saurem ($\text{pH} < 5,7$) dokumentierten Transportabfalls bei elektrophysiologischen Untersuchungen postulierten Lü *et al.* StFocA als pH-gesteuerten Anionenkanal (23) (Abbildung 1.5). Demnach verschließt der N-Terminus im Sauren die Transportpore (*gating*), was den Transportverlust erklärt. Molekulardynamische Simulationen lieferten widersprüchliche Aussagen über den Einfluss des N-Terminus (38, 37).

1.1.4.1 Transportmechanismen nach Lü *et al.* und Hub *et al.*

Lü, Einsle *et al.* schrieben dem zentralen Histidin für den Funktionsmechanismus von FNTs eine entscheidende Rolle zu, da sie durch eine Mutation zu Phenylalanin an dieser Stelle einen Funktionsverlust des StFocA beobachteten (35). Ihr postulierter Mechanismus der FNTs sieht vor, dass Anionen wie Formiat, die sich von extrazellulärer Seite nähern, von der geladenen (protonierten) Imidazol-Seitenkette des Histidins angezogen werden ($\text{pK}_s = 6,0$ in Wasser). Anschließend soll eine Protonenübertragung vom Histidin auf das Anion diesem als elektroneutrales Teilchen den Durchtritt durch die lipophilen Engstellen und die zentrale lipophile Kavität ermöglichen. Nach Passage des ungeladenen, protonierten Substrates soll das vom Histidin erhaltene Proton über ein an der zytosolischen Engstelle fixiertes Wassermolekül an das konservierte Threonin im L2-loop und von da in drei Protonenübertragungsschritten an das Histidin übertragen werden (Abbildung 1.6 B). Dieser Protonenstaffellauf (*proton relay*) funktioniere bidirektional und dient der Erklärung des beobachteten elektrogenen Transports von Anionen an FNTs bei pH-Werten über 5,6 (1).

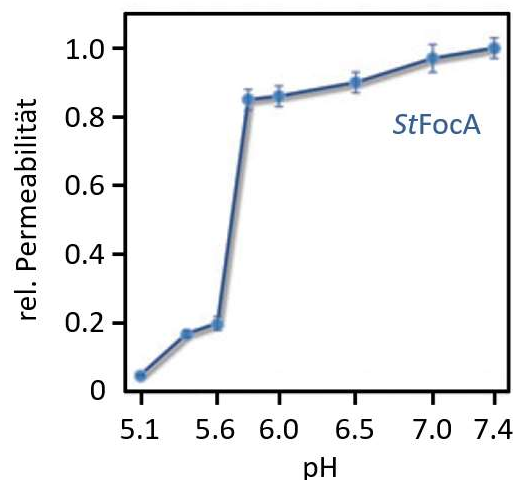


Abbildung 1.5: Elektrophysiologische Messungen von Lü *et al.* der Formiat-Permeabilität durch StFocA wurden als ein *gating*-Mechanismus ab pH 5,7 interpretiert, durch den sich der FNT von einem passiven Anionenkanal zu einem Transporter ändern soll. Abbildung entnommen und modifiziert aus (35).

Der elektroneutrale Transport im Sauren bei pH-Werten unter 5,7 soll ebenfalls durch das zentrale Histidin bewerkstelligt werden. Als alternative Reprotonierung des Histidins wird unter diesen Bedingungen unmittelbar nach Protonierung des Substratanions ein Proton aus dem Bulkwasser der extrazellulären Seite des Transportpfades auf die Imidazolseitenkette übertragen (Abbildung 1.6 C). Der Funktionsmechanismus wurde im Sauren als sekundär

aktiver Proton-Substrat-Symporter beschrieben, der von der *proton-motive force*, also dem Bestreben der Protonen zum Membranübertritt, abhängt (1). In der Theorie von Lü *et al.* kommt es zu einem Wechsel zwischen passiver, elektrogener Anion-Leitfähigkeit und sekundär aktivem, elektroneutralem Proton-Substrat-Symport in Abhängigkeit vom pH-Wert und der *proton-motive force* (1).

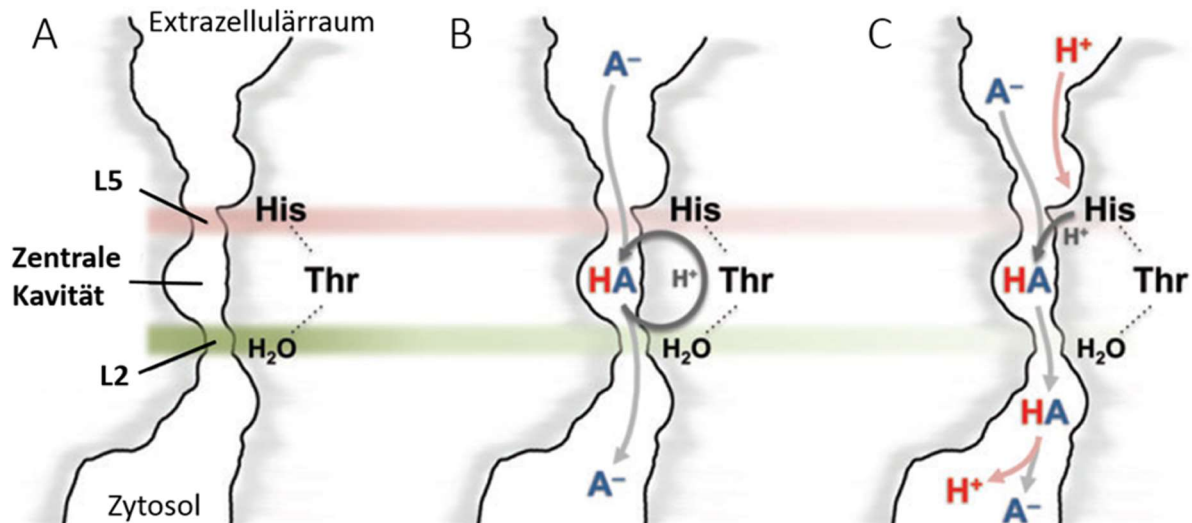


Abbildung 1.6: Postulierter Transportmechanismus von FNTs nach Lü *et al.* (A) Transportpfad mit zwei lipophilen Engstellen L2 und L5 unter- und oberhalb eines zentralen, lipophilen Hohlraums. (B) *Proton-relay*-Mechanismus über konservierte Histidin- und Threonin-Reste und ein fixiertes Wasser ermöglicht den bidirektionalen, passiven Anionen-Transport. (C) Sekundär aktiver Proton-Substrat-Symport wird durch die Protonenübertragung vom zentralen Histidin auf das Substratanion ermöglicht. Abbildung entnommen und modifiziert aus (1).

Atkovska und Hub untersuchten in Ihrer Arbeit durch molekulardynamische Simulationen, ob die Substratprotonierung durch das zentrale Histidin energetisch machbar ist (2) und erweiterten den von Lü *et al.* postulierten Mechanismus. Sie schlugen vor, dass das nötige Proton auch von der dem Substrattransport entgegengesetzten FNT-Seite stammen könne und somit der von Lü *et al.* gemessene elektrogene Transport durch FNTs beschreibbar sei. Anion und Proton sollen in die lipophile Engstelle diffundieren und dort erst der Protonierungsschritt zur Säure ablaufen. Dabei spielt die Änderung des Protonierungszustandes des zentralen Histidins eine entscheidende Rolle (H209, Abbildung 1.3). Eine Protonübertragung vom Bulkwasser auf das Substratanion wurde nicht untersucht.

Vergleicht man Abbildungen der realen FNT-Kristalldaten (Abbildung 1.3) mit der in dem von Lü *et al.* entworfenen schematischen Darstellung zum FNT-Funktionsmechanismus (Abbildung 1.6 A), so fällt auf, dass die Position des zentralen Histidins sich unterscheidet. Die Imidazolseitenkette des Histidins ragt unter realen Bedingungen in die zentrale, lipophile Kavität (5) und nicht in den Extrazellulärraum, wozu sie aus sterischen Gründen nicht in der

Lage ist (22, 6). Demzufolge müssten im Modell von Lü *et al.*, wie auch im Transportmechanismus nach Hub *et al.*, das geladene Säure-Anion und das Proton die lipophile Engstelle am L5-*loop* überwinden damit das zentrale Histidin die Substratprotonierung ermöglichen kann.

1.1.4.2 Der FNT-Transportmechanismus nach Wiechert und Beitz: *dielectric slide*

In unserer Arbeitsgruppe wurde ausgehend von Untersuchungen an *PfFNT* und *EcFocA* ein alternativer Transportmechanismus der FNTs postuliert (3, 39). Die Grundlage dafür boten Messungen an Hefezellen, die das jeweilige FNT-Protein exprimierten. Radioaktiv markiertes Substrat wurde pH-abhängig in die Hefezellen aufgenommen, wobei hier nicht nur elektrogener (Säureanion), sondern der Gesamttransport untersucht wurde. Dabei stellte sich heraus, dass der mit elektrophysiologischen Messungen beobachtete Transportabfall im Sauren (35) (Abbildung 1.5) durch den Transport der elektroneutralen Form erklärbar war (3). Die bestimmten Transportraten stiegen dabei im Sauren bis zu einem Maximum im Bereich des pK_S -Wert des Substrats an und sanken danach bei weiterer Senkung des pH-Wertes wieder ab, so dass sich ein glockenförmiger Kurvenverlauf ergab (Abbildung 1.7). Im Bereich von neutralem pH-Wert bis zum pK_S -Wert des Substrats bedingte die erhöhte Protonierungswahrscheinlichkeit der Substrat-Anionen durch das Bulkwasser im Vestibül eine Zunahme der Transportrate. Bei weiter Senkung des pH-Wertes wurden die vorwiegend protonierten, ungeladenen Substratmoleküle in der Messlösung der Anziehung durch Lysin-Reste unzugänglich und die Transportrate nahm ab. Der glockenförmige Verlauf geht auf zwei auftretende pK_S -Werte der Substratmoleküle zurück. In wässriger Lösung zeigt Formiat einen pK_S -Wert von 3,8, dieser steigt jedoch durch den Eintritt in das lipophile Vestibül auf 4,3 bei *EcFocA* und 5,3 bei *PfFNT*, was die Substratprotonierung ermöglicht (3). Der direkte Nachweis des Proton-Substrat-Symports wurde durch Messung der extrazellulären pH-Wertänderung einer Hefezellsuspension nach Zugabe von Formiat erbracht. Dabei zeigte sich während des Transports in die Zellen eine Alkalisierung des umgebenden Mediums (15, 3). Es wurde durch Transportversuche mit schwerem Wasser (Deuteriumoxid) gezeigt, dass die Protonierung sehr wahrscheinlich nur in einem einzigen Schritt abläuft, was den beiden anderen postulierten, mehrschrittigen Protonenübertragungs-Mechanismen widerspricht (1, 2). Durch die Beobachtung, dass durch Zugabe von Protonophoren der Transport sowohl im Sauren als auch im Basischen zum Erliegen kommt (3, 15), konnte gezeigt werden, dass der Proton-Substrat-Symport den Hauptmechanismus der FNTs darstellt und der von Lü *et al.* gemessene elektrogene Transport im Neutralen bis Basischem nur eine untergeordnete Rolle spielt (3).

Einleitung

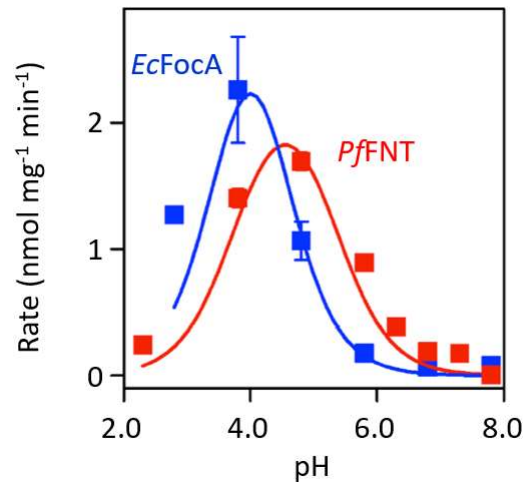


Abbildung 1.7: ¹⁴C- Formiat-Aufnahmeraten, die an FNT-exprimierenden Hefezellen bestimmt wurden zeigen einen glockenförmigen Verlauf, wobei die maximale Aufnahmerate im Bereich des Substrat-pK_s liegt. Ermittelte Raten von vier unabhängigen Versuchen mit *EcFocA* in blau und *PfFNT* in rot und Fehlerbalken als S.E.M. dargestellt. **Abbildung übernommen und modifiziert aus (3).**

Durch Analyse der Kristalldaten wurde außerdem ein konserviertes Lysin (K156 in *EcFocA*) identifiziert, das sich oberhalb der extrazellulären Engstelle befindet, was in dem von Wiechert und Beitz postulierten Transportmechanismus von zentraler Bedeutung ist. Für den Substratexport befinden sich symmetrisch angeordnete Lysine mit schwächerer Konservierung auf der zytosolischen Seite der FNTs. Die permanente Ladung an diesen Lysinen führe laut Wiechert und Beitz dazu, dass Substratanionen angezogen werden. Durch die lipophile Umgebung käme es zur Absenkung der Dielektrizitätskonstante und somit der Substratazidität. Durch das Bulk-Wasser würde ein Proton auf das Substratanion übertragen, welches als neutrales Säuremolekül die beiden Engstellen entlang seines Konzentrationsgefälles passiert. Nach dem Durchtritt dissoziiert die Säure in Abhängigkeit des vorherrschenden pH-Wertes wieder zu Säureanion und Proton (3, 39).

Einleitung

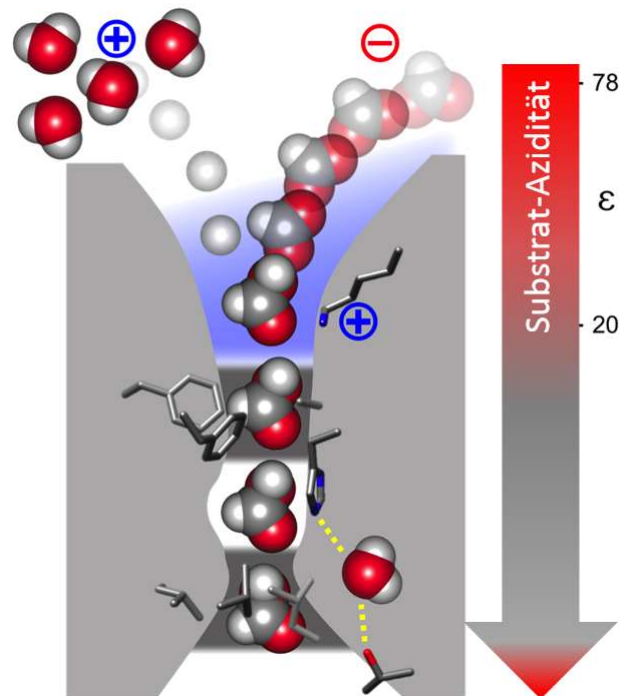


Abbildung 1.8: Postulierter Transportmechanismus von FNTs nach Wiechert und Beitz (39). Aufgrund der elektrostatischen Anziehung eines konservierten Lysins am Poreneingang (blau) wird ein Formiat-Anion in Richtung der lipophilen Konstriktion gezogen. Durch die erhöhte Lipophilie in der Molekül-Umgebung kommt es zur Senkung der Dielektrizitätskonstante (ϵ) und der Protonierung des Formiat-Anions durch das Bulkwasser. Der Durchtritt der protonierten, elektroneutralen Ameisensäure durch die beiden lipophilen Engstellen (dunkelgrau) ist gegenüber dem Durchtritt des geladenen Formiat-Anions stark bevorzugt.

Im Gegensatz zu der *gating*-gesteuerten Anion-Kanal- und der Proton-Substrat-Symport-Theorie beschreiben Rycovska *et al.* den FNT *StNirC* aufgrund ihrer elektrophysiologischen und fluorimetrischen Messungen als einen Anionen-Protonen-Antiporter (14). Die elektrophysiologischen Untersuchungen stimmten dabei mit bisherigen Untersuchungen von Lü *et al.* überein und bewiesen, dass *StNirC* Nitrit transportiert. Die Fluoreszenzmessungen mit Acridinorange an *StNirC*-Membranvesikeln zeigten eine Abnahme der Protonenkonzentration innerhalb der Vesikel während des Nitrit-Transports. Der beobachtete elektrogene Anionen-Protonen-Antiport konnte durch keine anderen Untersuchungen an FNTs unterstützt werden und ob *StNirC* in dieser Weise funktioniert sollte daher kritisch hinterfragt werden.

1.1.5 Die Rolle des zentralen Histidins in FNTs

Durch Mutation des konservierten Lysins K156 am Poreneingang von *EcFocA* zu Cystein, Methionin oder Alanin kommt es zu starker Abnahme der FNT-Transportfunktionalität (3), was die *dielectric-slide*-These unterstützt. Aber auch Mutationen des zentralen Histidins führen in verschiedenen FNTs zu Funktionsverlust (3, 35), was möglicherweise an seiner essenziellen Bedeutung für den Transportmechanismus oder an der gestörten Tertiärstruktur im Poren-Bereich der Mutanten liegt. Es verbleibt deshalb die Frage, warum FNTs ein hochkonserviertes Histidin in der zentralen Position aufweisen und ob dieses für die Funktionalität von FNTs entscheidend ist.

Beim Alignment von 2.206 FNTs aus der Datenbank dbFNT fällt auf, dass 27 putativ natürlich vorkommende FNTs eine Variation an der Stelle des zentralen Histidins aufweisen. Dort finden sich anstelle des protonierbaren Histidins nicht protonierbare Aminosäuren. Eine Gruppe von sechs FNTs weisen an dieser Stelle ein Asparagin und eine Gruppe von 21 FNTs ein Glutamin auf. Jeweils ein Vertreter dieser beiden FNT-Gruppen wurde für die vorliegende Arbeit ausgewählt, um sie zu charakterisieren. Sollten diese FNTs ohne zentrales Histidin funktionell sein, so spräche das für den *dielectric-slide*-Mechanismus nach Wiechert und Beitz. Wenn sie keine Funktion zeigen, würde dies darauf hindeuten, dass der von Lü *et al.* postulierte Transportmechanismus die FNT-Funktionsweise richtig beschreibt. Als Vertreter mit einem zentralen Asparagin wurde der FNT *EhFNT* aus *Entamoeba histolytica*, als Vertreter der FNTs mit einem zentralen Glutamin wurde *BtFdhC1* aus *Bacillus thuringiensis* ausgewählt. Beide weisen konservierte Lysine am zytosolischen und extrazellulären Poreneingang auf. Bei *EhFNT* befinden sich die beiden entsprechenden Lysine an Position 100 und 230, bei *BtFdhC1* an Position 20 und 149 (K26 und K156 in *EcFocA*, Abbildung 1.10).

Einleitung

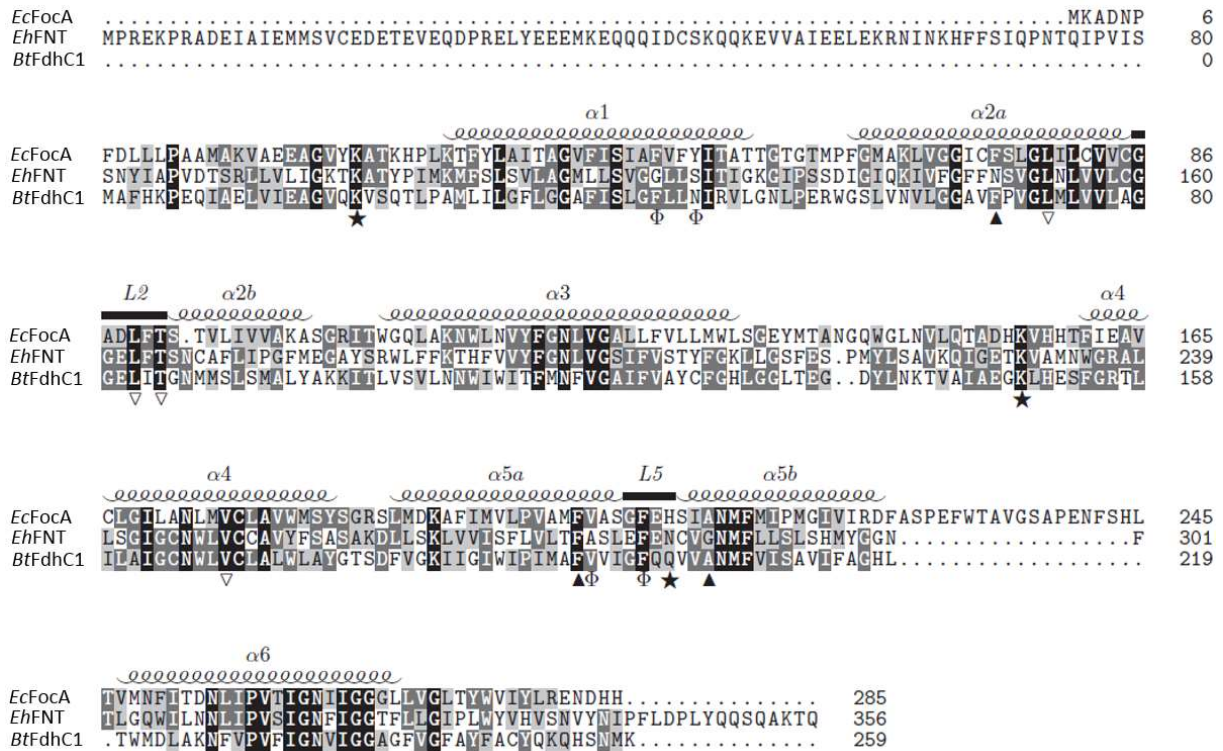


Abbildung 1.9: Sequenz-Alignment von *EcFocA*, *EhFNT* und *BtFdhC1*. Die Transmembrandomänen stammen von der A-Kette der FocA Struktur PDB #3Q7K und sind über den Sequenzen gezeigt. Die beiden intrahelikalen *loop*-regionen sind mit L2 und L5 markiert. Die Aminosäuren, welche die lipophilen Konstriktionen bilden, sind mit Dreiecken markiert (schwarz nach oben: extrazellulär/periplasmatisch, weiß nach unten: zytosolisch). Die Aminosäuren, die den ϕ /K-Selektivitätsfilter bilden, sind mit ϕ gekennzeichnet. Das zentrale Histidin (H209 in *EcFocA*) und seine Substituenten Asparagin (N283 *EhFNT*) oder Glutamin (Q202 in *BtFdhC1*) sind genau wie die konservierten Lysine in Poreneingangsnähe mit Sternen markiert.

Einleitung

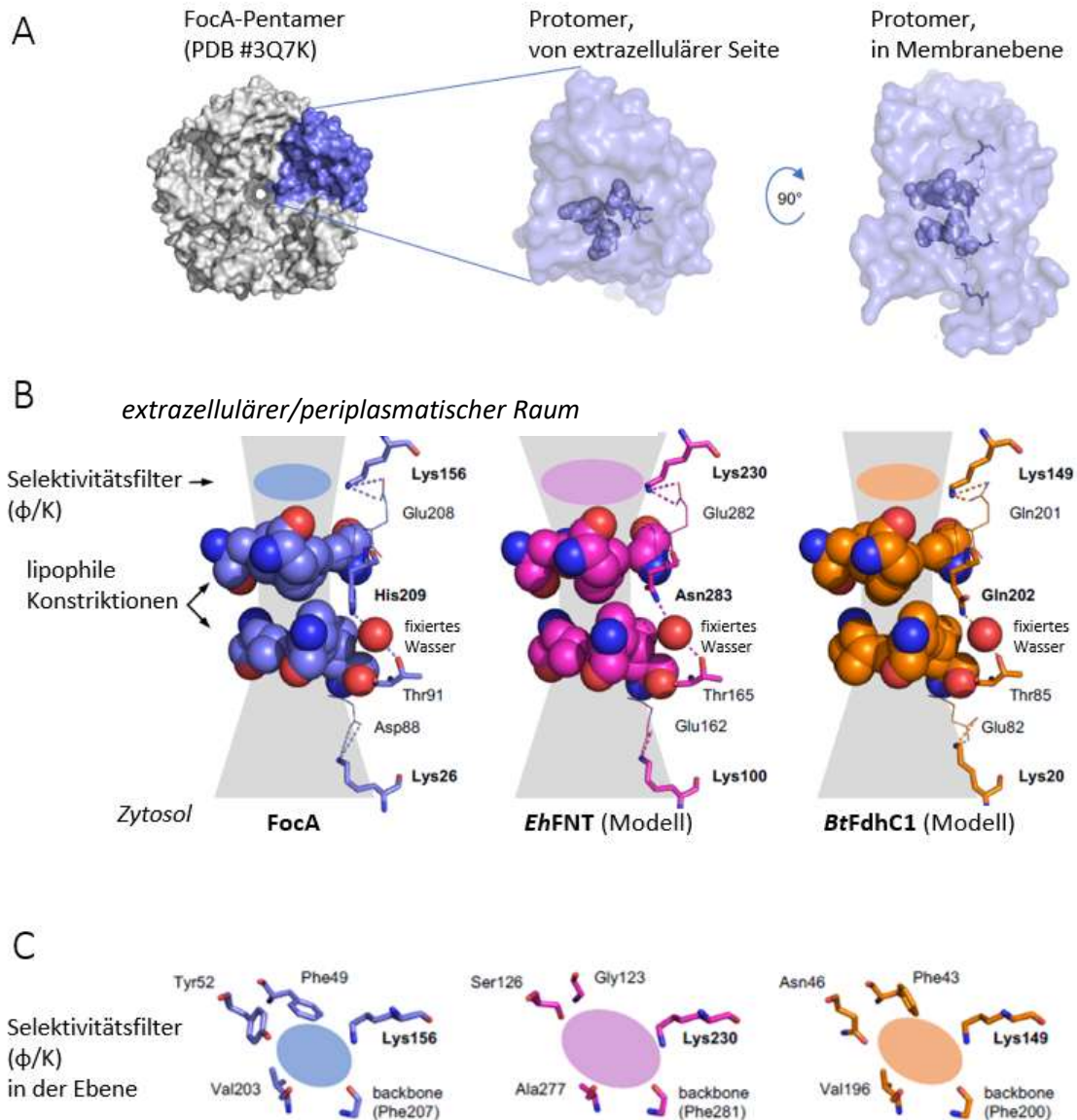


Abbildung 1.10: Struktureller Vergleich des Prototyp-FNT FocA mit den beiden in dieser Arbeit untersuchten FNTs EhFNT und BtFdhC1 ohne zentrales Histidin. (A) Von der extrazellulären Seite betrachtetes FocA-Pentamer (PDB #3Q7K) (links) sowie Protomer (Mitte) und das Protomer nach Drehung in die Membranebene (rechts). Im Protomer sind die Schlüssel-Aminosäuren des Transportpfades hervorgehoben. (B) Detail-Ansicht des Transportpfades in der Membranebene von FocA (links), EhFNT (Mitte) und BtFdhC1 (rechts). Die lipophilen Engstellen sind in raumfüllender Struktur dargestellt. In zentraler Position zwischen den beiden Engstellen sitzt bei FocA das stark konservierte, protonierbare Histidin. EhFNT und BtFdhC1 tragen an dieser Stelle die beiden nicht protonierbaren Aminosäuren Asparagin beziehungsweise Glutamin. Sowohl protonierbare als auch nicht protonierbare Aminosäuren stehen über ein fixiertes Wasser mit einem konservierten Threonin in Verbindung. Die drei FNTs weisen konservierte, symmetrisch positionierte Lysine an der zytosolischen und der extrazellulären/periplasmatischen Engstelle auf. Die Ebenen des Selektivitätsfilters sind als farbige Ovale dargestellt. (C) Die Aufsicht auf den ϕ/K -Selektivitätsfilter der drei FNTs, von extrazellulärer Seite aus betrachtet.

1.1.6 Direktionalität von FNTs

FNTs nehmen in ihrer physiologischen Rolle die Funktion des Imports metabolischer Edukte oder des Exports metabolischer Endprodukte ein. Poisson-Boltzmann-Elektrostatik-Berechnungen zeigen, dass verschiedene FNT-Vertreter, deren physiologische Funktion vorwiegend der Export ist, an ihrer zytoplasmatischen Seite stärker positiv geladen sind als an ihrer periplasmatischen Seite (Abbildung 1.11). Dadurch kommt es an der zytosolischen Seite zu einer höheren elektrostatischen Anziehung von negativ geladenen Substraten, was zu einem bevorzugten Substratexport führen könnte.

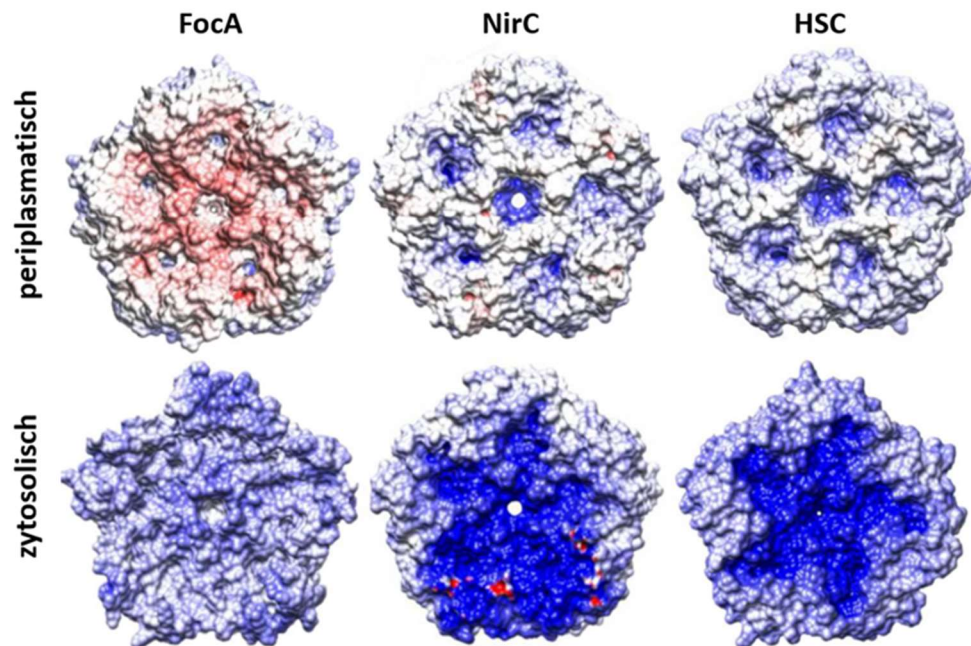


Abbildung 1.11: Poisson-Boltzmann-Elektrostatik Profile ausgewählter FNTs. Negative Ladungen werden rot und positive Ladungen blau dargestellt. Die Berechnung und Darstellung wurde mit dem APBS *tool* der Chimera© Software durch Dr. Marie Wiechert durchgeführt. Dafür wurden folgende PDB-Strukturen verwendet: 3KLY (FocA), 4FC4 (NirC) und 3TDO (HSC).

Unsere Arbeitsgruppe konnte an FNTs den pH-abhängigen Transport von Substraten beobachten. Dabei wurde bisher vorwiegend der Substratimport in FNT-exprimierende Hefezellen betrachtet, was bei den untersuchten FNTs *PfFNT* und *EcFocA* nicht der physiologischen Transport-Richtung entspricht (3, 15). Erste Untersuchungen, ob FNTs tatsächlich bevorzugt in eine Richtung transportieren und ob der pH-abhängige Proton-Substrat-Symport auch in physiologischer Richtung beobachtbar sei, wurden bisher nur in kleinem Umfang durchgeführt. Die Gruppe von Kieran Kirk konnte in Versuchen an plasmodialen Trophozoiten zeigen, dass die Inhibierung von *PfFNT* zu einem ansteigenden pH-Wert innerhalb der Zellen führt (21). In unserer Arbeitsgruppe konnte zudem an *PfFNT*-Liposomen und im Hefe-Assay gezeigt werden, dass dieser FNT die Substrate Formiat, Acetat und L-Laktat bei pH 6,8 in beide Richtungen transportiert (40, 15, 3). Ein direkter Nachweis, dass der isolierte *PfFNT* die von Wiechert *et al.* beobachtete pH-Abhängigkeit des

Substratimports auch in der physiologischen Exportrichtung aufweist, steht noch aus. Ein solcher Nachweis wäre ein Indiz dafür, dass der von unserer Arbeitsgruppe postulierte *dielectric-slide*-Mechanismus den Transportmechanismus von FNTs korrekt darstellt.

1.1.7 Der Formiat-Nitrit-Transporter in *Entamoeba histolytica* EhFNT

Der Erreger der Amöben-Ruhr *E. histolytica* besitzt keine Mitochondrien und keinen funktionierenden Citrat-Zyklus, weshalb die Energiegewinnung durch Abbau energiereicher Verbindungen in Gärungsprozessen abläuft (41–43). Hauptrolle im Energiestoffwechsel übernimmt dabei die Glykolyse der über einen GLUT-Transporter aufgenommenen Glukose (44–46) mit den Endprodukten Ethanol, Acetat und CO₂ (47, 48) (Abbildung 1.12). Das Verhältnis der gebildeten Metabolite variiert abhängig von den herrschenden Bedingungen (49, 50, 48). Auch die Energiegewinnung durch Aminosäure-Abbau wird postuliert (51, 52) mit den Endmetaboliten Acetat und Propionat (53), wobei die Datenlage hier widersprüchlich ist (54). Weitere Untersuchungen deuten darauf hin, dass *Entamoeba*-Zellen im Kolon die niedrige Kohlenstoffverfügbarkeit in Form von Glukose von ca. 1,11 mM (55, 56) durch die Aufnahme der verfügbaren kurzen Fettsäuren Acetat, Butyrat oder Propionat (gesamt 120 mM) ergänzen (57). Der potenzielle Monocarboxylat-Transporter EhFNT könnte Substrataufnahme und Metabolit-Abgabe je nach Wachstumsbedingungen des Parasiten ermöglichen. EhFNT wird im Gegensatz zu vielen anderen *E. histolytica*-Proteinen auf RNA-Ebene unabhängig von der angebotenen Glukose-Menge und dem Zellstadium (Zyste oder Trophozoit) exprimiert (58, 55), (59) (Abbildung 9.1 im Anhang). Eine Analyse des Genoms des pathogenen *E. histolytica*-Stammes HM-1:IMSS (60) ergab, dass der Erreger nur eine für einen FNT-kodierende DNA-Sequenz besitzt (Gen-ID: JCVI-ESG2-1.0 in NCBI Datenbank), welche nicht offensichtlich mit in metabolischen Prozessen involvierten Proteinen assoziiert lokalisiert ist, wie es bei Prokaryoten oft der Fall ist (9, 61, 12, 62, 13). EhFNT nimmt daher möglicherweise eine zentrale Rolle beim Transport kleiner, einfach negativ geladener Teilchen über die Zellmembran ein. Da der Transportmechanismus von kleinen Monocarboxylaten wie Acetat in und aus *E. histolytica* bis dahin ungeklärt ist, ist die Funktionsuntersuchung von EhFNT von höchstem Interesse.

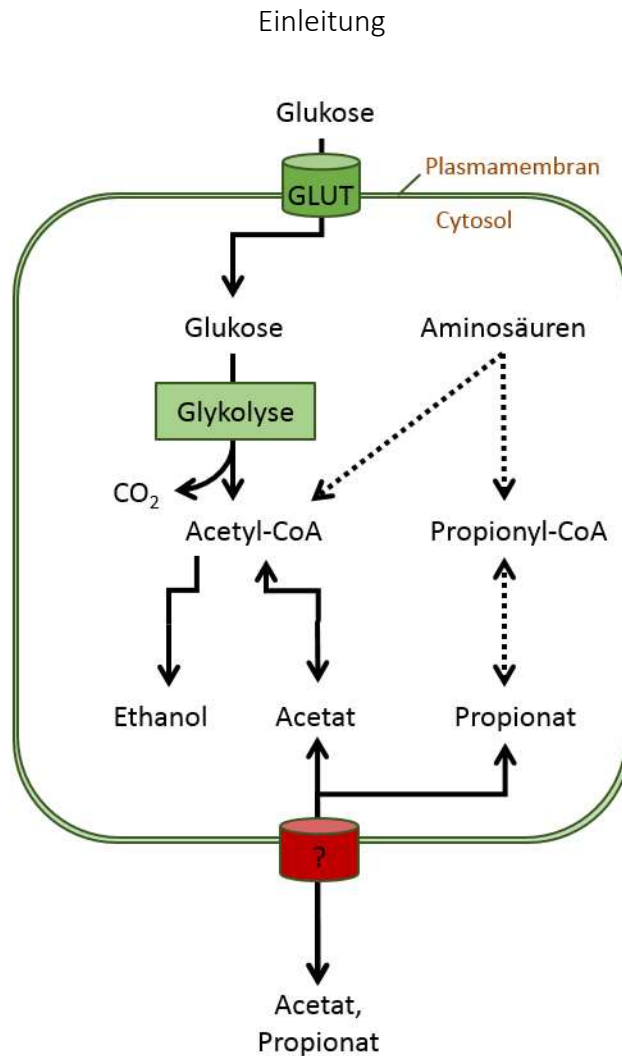


Abbildung 1.12: Energieliefernder Metabolismus von *E. histolytica* nach (50, 47, 51). Der Einfluss von Aminosäuren wird derzeit untersucht und diskutiert (gepunktete Linien). EhFNT übernimmt möglicherweise die Import- und Export-Funktion von kurzkettigen Fettsäuren (roter Zylinder). Abbildung erstellt mit Microsoft® Office PowerPoint®.

1.1.8 Der Formiat-Nitrit-Transporter in *Bacillus thuringiensis* BtFdhC

Bacillus thuringiensis ist ein grampositives, aerobes, stäbchenförmiges Bakterium, was vorwiegend im Boden gefunden wird, wo es in Gesellschaft mit Pflanzenwurzeln lebt. Es bildet sogenannte Cry-Toxine aus, die eine hohe Toxizität gegenüber Insekten bei gleichzeitig guter Verträglichkeit für Säugetiere aufweisen, was in Agrar-Technik und Agrar-Gentechnik Anwendung findet (63). *B. thuringiensis* gehört wie die für den Menschen gefährlichen Organismen *B. anthracis* und *B. cereus* zur *B. cereus*-Gruppe (64). Die Mitglieder dieser Untergruppe der Gattung *Bacillus* unterscheiden sich vorwiegend in ihren Plasmiden (65) (Abbildung 1.14) und besitzen identische chromosomale DNA-Sequenzen für jeweils drei putative FNTs (Abbildung 9.2 Anhang). Alle Vertreter der *B. cereus*-Gruppe weisen eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen der jeweiligem FNTs von mindestens 95 % auf. Die *B. thuringiensis*-FNTs werden in dieser Arbeit BtFdhC1 (GenBank: AGE79418.1), BtFdhC2 (GenBank: AGE79589.1) und BtFdhC3 (GenBank: AGE77115.1) genannt. Diese drei verschiedenen FNTs ermöglichen *B. thuringiensis* vermutlich den Transport von

Monocarboxylaten, Nitrit oder Hydrosulfid über die Zellmembran, ähnlich den bereits beschriebenen FNTs (6, 3, 16, 62, 13, 24). *BtFdhC1* ist auf dem gleichen Gen-Lokus wie Formiat-Dehydrogenase assoziiert (Abbildung 9.3 im Anhang). Es ist, deshalb wahrscheinlich, dass Formiat durch *BtFdhC1* transportiert wird. Ähnliches wurde bereits für den FNT des Archaeons *Methanobacterium formicium* *MfFdhC* beobachtet (61). Da sich bei der Glykolyse von *Bacillus*-Arten die typischen FNT-Substrate Formiat, Acetat und L-Laktat als Metabolite bilden ((66, 67), Abbildung 1.13), ist die Aufklärung ihres Transportmechanismus von pharmazeutischer Relevanz.

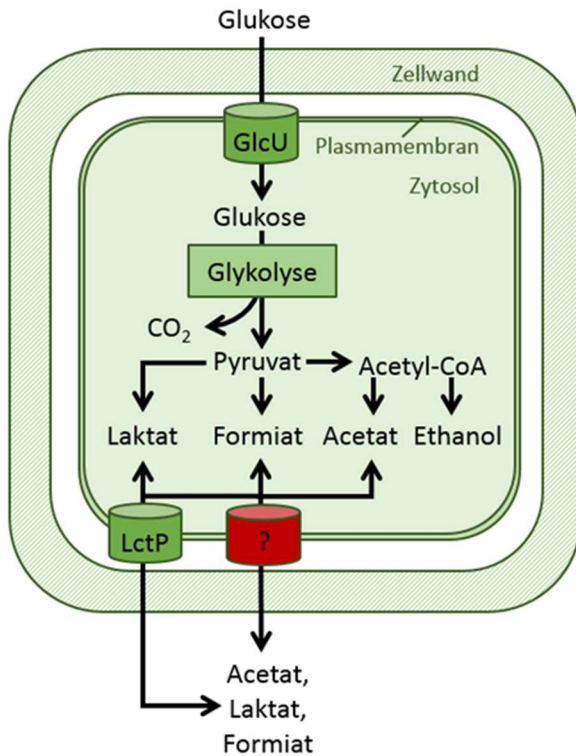


Abbildung 1.13: Glukose-Metabolismus von *B. cereus* modifiziert nach (66). Eine Laktat-permease LctP und Malat+H⁺ / L-Laktat+Na⁺-Antiporter sind für den Laktattransport zuständig (68–70). Abbildung erstellt mit Microsoft® Office PowerPoint®.

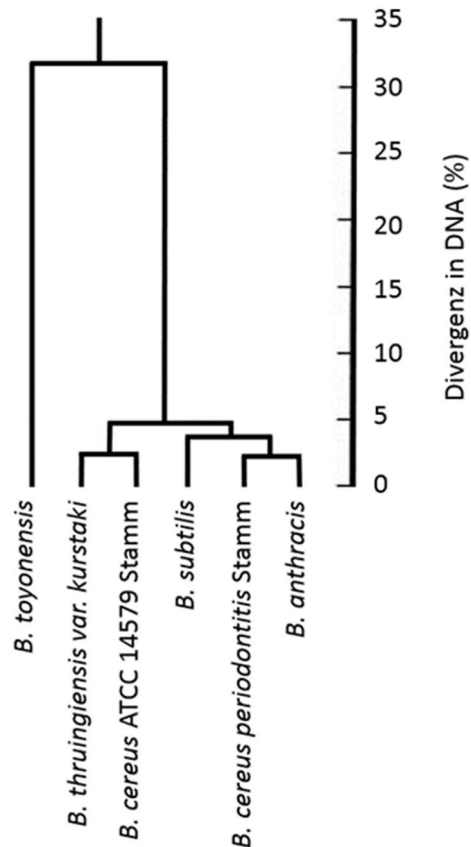


Abbildung 1.14: Dendrogramm von *Bacillus*-Arten basierend auf DNA-Sequenzen modifiziert nach (65).

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Die Gruppe der FNT-exprimierenden Organismen umfasst viele pharmazeutisch, biotechnologisch und landwirtschaftlich relevante Organismen (15, 1), weshalb Erkenntnisse über die Funktionsweise der FNTs von allgemeinem Interesse ist. So ist der Transport von Monocarboxylaten wie Formiat sowohl für den Erreger der Amöben-Ruhr *E. histolytica* als auch für humane Zellen essenziell. In *E. histolytica* könnte diese Rolle von einem FNT übernommen werden, während im menschlichen Körper diese Aufgabe Monocarboxylat-Transporter (MCT) übernehmen, die strukturell und mechanistisch mit FNTs nicht verwandt sind (71). Es erscheint daher wahrscheinlich, dass eine Inhibierung des Substrattransports von FNTs durch geeignete Moleküle nicht mit einer hemmenden Wirkung an humanen MCTs assoziiert ist. Aufgrund dieser Annahme stellen FNTs potenzielle *drug targets* dar (20). Ein erster Schritt, um eine rationale Synthese von Wirkstoffen, die an FNTs angreifen, zu ermöglichen, ist das Verständnis ihrer Funktion und die Aufklärung ihrer dreidimensionalen Struktur. Die Funktion der FNTs wird bisher durch sich gegenseitig ausschließende Theorien beschrieben. Da nur eine dieser Theorien eine Funktionalität von FNTs ohne zentrales Histidin plausibel erklären kann, ist das Ziel dieser Arbeit die erstmalige Charakterisierung zweier natürlich auftretender putativer FNTs ohne zentrales Histidin, *EhFNT* und *BtFdhC1*, hinsichtlich ihrer Funktionalität und ihrer Substratspektren. Die Untersuchungen von FNTs ohne zentrales Histidin bezüglich eines möglichen Proton-Substrat-Symports sowie ihre Direktionalität liefern weitere Informationen, um die postulierten Mechanismen auf ihre Plausibilität zu überprüfen.

2 Material

2.1 Enzyme, Chemikalien, Kits, Material

Anatrace, Maumee, USA

n-Dodecyl- β -D-Maltopyranosid (DDM), *n*-Dodecyl-phosphocholin (Fos-Cholin 12)

AppliChem, Darmstadt

Polyoxyethylen(23)-laurylether (Brij[®] 35), Polyoxyethylen(20)-cethylether (Brij[®] 58Xa), Calciumacetat, Magnesiumchlorid, Zinkacetat, Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat (Tween[®] 20), Natriumlaurylsulfat, Natrium-L-Laktat, Phosphoenolpyruvat

Avanti Polar lipids, Alabaster, USA

E. coli Polar Lipid Extract powder

Becton, Dickinson and Company, Heidelberg

Bacto™ Yeast Extract, Bacto™ Trypton,

Beckman Coulter, Krefeld

Genome™ LabDTCS *Quick Start Kit*, Microfuge Tube Polyallomer, *centrifuge bottles* Polycarbonate 26,3 ml

Bio-Rad, München

Bio-Rad QuickStart™ Bradford *Protein Assay*

GE Healthcare, Freiburg

Amersham™ ECL Plus Western Blotting *detection system*, PD MidiTrap G-25, Blotting Membranes Amersham™ Hybond™ 0,45 PVDF, Whatman[®] *chromatography paper* 3MM, Q Sepharose Fast Flow

Genaxxon BioScience Ulm

Ampicillin, Tetramethylethyldiamin (TEMED), Agarose LE

Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig

¹⁴C-Formiat

J.T. Baker, München

Ethanol, Methanol, Isopropanol, Essigsäure, Salzsäure, Schwefelsäure

Life Technologies GmbH, Darmstadt

Pyranin (8-Hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonat)

Macherey-Nagel, Düren

NudleoBond PC 500

Merck Chemicals, Darmstadt

Amicon Ultra-4 *Centrifugal Filter Unit with Ultracel-30 kDa cut-off membrane*,
Amicon Ultra-4 *Centrifugal Filter Unit with Ultracel-100 kDa cut-off membrane*

MP Biomedical, Illkirch, Frankreich

Ethidiumbromid

New England BioLabs GmbH, Frankfurt

OneTaq® DNA Polymerase

Oxoid, Basingstoke, USA

Agar bacteriological

Peqlab, Erlangen

peqGold *prestained protein marker III*

Promega, Mannheim

Wizard® Plus SV *Minipreps DNA Purification System*

Qiagen, Hilden

Ni-NTA-Agarose, Faktor Xa Protease 400 U

Roche Diagnostics, Mannheim

cOmplete™ EDTA-free Proteaseinhibitor, Pyruvatkinase, *E. coli*-tRNA, Restriktionsprotease
Faktor Xa

Roth, Karlsruhe

LB-Medium, LB-Agar, Milchpulver *blotting grade*, Rotiphorese® Blau R, EDTA, MES, HEPES,
TRIS-Acetat, Glycerol, Glukose, 2-Mercaptoethanol, Dialyseschlauch Visking (14 kDa *cut-off*),
Natriumazid, Natriumacetat, Sterilfilter Filtropur S 0.2, alle weiteren nicht aufgeführten
Chemikalien

Sartorius, Göttingen

Cellulose Acetat Filter

Science Services, München

continuous carbon grids (400 mesh, thin) (TEM)

Sigma Aldrich, München

Natrium-Formiat, Lithiumacetat, Imidazol, Polyoxyethylen(20)-stearylether (Brij® 78), Polyoxyethylen(20)-oleylether (Brij® 98), Magnesiumacetat, Polyoxyethylenglycol 8000, L-Arginin, L-Asparagin, L-Cystein, L-Glutamin, L-Lysin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Isoleucin, L-Aspartat, L-Thyrosin, L-Tryptophan, L-Threonin, L-Alanin, L-Glutamat, L-Prolin, L-Serin, Adenin, Uracil, Coomassie G250, Antifoam Y30, Digitonin, *glass beads* (säuregewaschen), Carbonylcyanid-*m*-chlorophenylhydrazon (CCCP), 9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridin (ACMA)

Süd-Laborbedarf, Gauting

Hi Yield® Gel/PCR DNA *Fragment Extraction Kit*

Thermo Fisher Scientific, Schwerte

Slide-A-Lyzer *dialysis cassette* MWCO 10 kDa 3 ml, Restriktionsendonukleasen, RiboLock RNase Inhibitor, dNTPs, T4-DNA-Ligase, *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIAP)

VWR International GmbH, Hannover

Szintillationsfläschchen Snaptwist®, Glasfaserrundfilter CF/C 25 mm

Zinsser Analytics, Frankfurt

Szintillation Cocktail Mix Quicksafe A

2.2 Geräte

A&D company Ltd, Tokyo, Japan

Vibro Viscometer SV-10

Agilent Technologies, Waldbronn

UV/Vis-Spektrometer Varian Cary 50 UV-Vis

Anton Paar GmbH, Graz, Österreich

Densitometer DMA™ 48

Avestin, Mannheim

Liposomen-Extruder LiposoFast

Beckman Coulter, Krefeld

Optima™ XL-80 K Ultrazentrifuge, Rotor 50.2 Ti, Rotor SW 60 T

DNA Sequencer-CEQ™ 8000, GenomeLab™ Separationskapillaren

Bio-Rad, München

Power Pac 200, Trans-Blot SD *semi-dry transfer cell*

Elysia & Raytest GmbH, Straubenhardt

Gel-Dokumentationssystem IDA

Eppendorf AG, Hamburg

BioPhotometer®, Innova® U535 Tiefkühlschrank

Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

Wasserbad

Heraeus holding, Hanau

Multifuge™ 1S-R, Kelvitron® T (Brutschrank), Biofuge™ Pico

IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen

Ikmag® Ret-GS (Magnetrührer/Heizplatte)

Infors HAT, Bottmingen, Schweiz

Brutschrank Minitron

Jasco, Gross-Umstadt

BioLogic *stopped-flow* Anlage:

Spannungsquelle ALX 250, Photomultiplier PMS 250, MPS 70/2 *microcompressor unit*, FC-15/7.5 Küvette, SFM-2000 Mischeinheit, MOS-200 UV/Vis und Fluoreszenzspektrometer, BH-10-61 UV Monochromator, PCI *connector block* 6221, Biokine Software Version 4.70

JOEL Ltd., Peabody, MA, USA

JOEL 1400 Plus Elektronenmikroskop

Keison International, Essex, UK

Grant Bio PTR-30 *360-degree vertical multi-function rotator*

Malvern Panalytical, Malvern, UK

Nano series Zetasizer ZS

PerkinElmer, Waltham, USA

Fluorimeter LS 55, Halb-Mikroküvette, QS, 4/4 mm

TRI-CARB 2000TR *Liquid Scintillation Analyzer*

PeqLab, Erlangen

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

Roche Diagnostics, Mannheim

Lumi-Imager™ F1 Bild-Dokumentationssystem

Savant Instruments, Farmigoale, USA

Vakuumentrifuge DNS SpeedVac® DNA 110

Sartorius AG, Göttingen

BIOSTAT® APlus (Fermenter)

Schott Instruments, Mainz

Digital-Labor-pH-Meter Lab 850

Scientific Industries, Bohemia, USA

Vortex®-Genie 2

Thermo Scientific, Schwerte

Hochdruck-Homogenisator French Press *cell disrupter* FA-078

TVIPS GmbH, München

TVIPS F416 Digitalkamera

2.3 Plasmide

Die Darstellung der genutzten Plasmide erfolgte mit PlasMapper Version 2.0 (72).

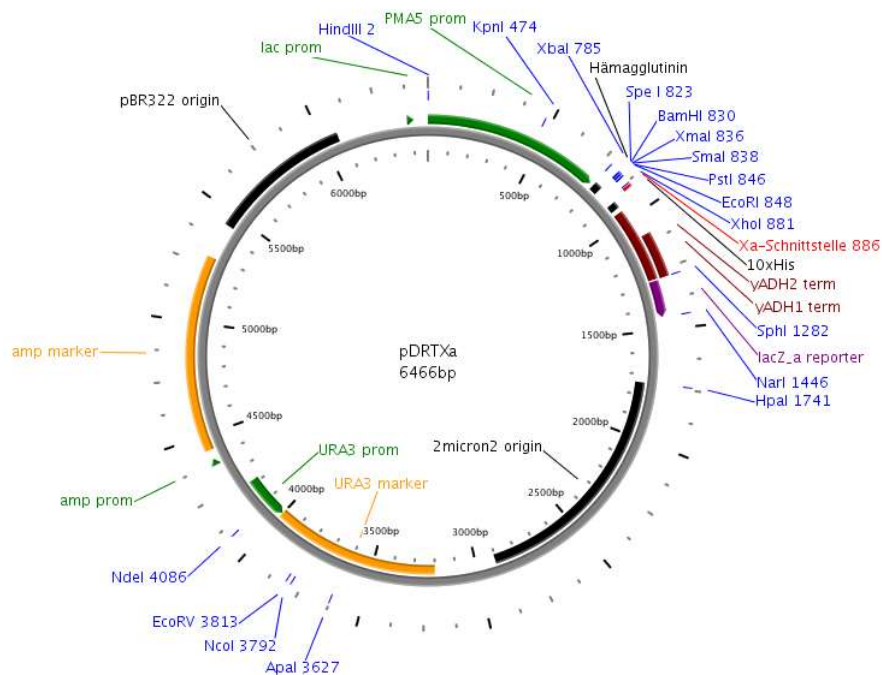


Abbildung 2.1: pDRTXa Hefe-*high-copy*-Vektor pDR196. Modifizierung durch Einführung von N-terminalen Hämagglutinin-tag (HA) sowie C-terminal Faktor Xa-Schnittstelle mit anschließendem 10xHis-tag (His).

Material

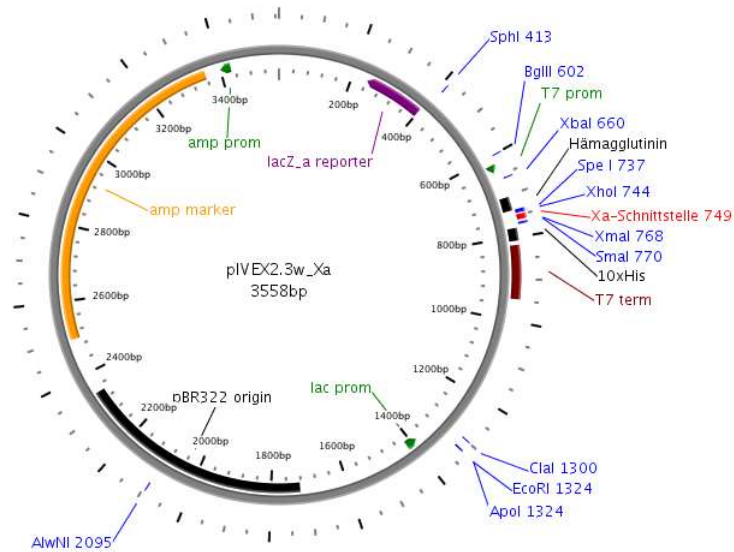


Abbildung 2.2: pIVEX2.3w_Xa-Vektor. Zellfrei-Proteinsynthese-Vektor pIVEX2.3 für das *cell free* RTS *E. coli* system modifiziert durch Einführung von N-terminalen Hämagglutinin-tag und Faktor Xa-Schnittstelle zwischen dem offenen Leserahmen und dem C-terminalen 10xHis-tag. Zur zellfreien Herstellung großer Proteinmengen.

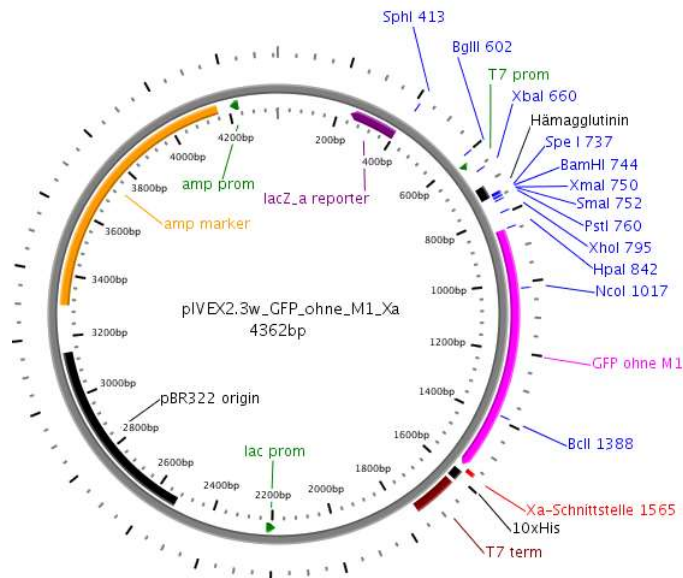


Abbildung 2.3: pIVEX2.3w_GFPΔM1_Xa-Vektor. Zellfrei-Proteinsynthese-Vektor pIVEX2.3w_Xa erweitert durch GFP ohne Startmethionin zwischen dem offenen Leserahmen und der Faktor Xa-Schnittstelle. Zum *Screening* der besten Herstellungsbedingungen im CECF-System.

2.4 Kodierende DNA-Sequenzen

Die genutzte DNA wurde in ihrer Nukleotid-Sequenz für die Expression in Hefe optimiert.

Name	Beschreibung	Entrez Gene ID
<i>EhFNT</i>	Formiat-Nitrit-Transporter aus <i>E. histolytica</i> EHI_198990 Gen aus HM -1:IMSS Stamm Beschrieben in (60).	3407616
<i>EhFNTΔN1-90</i>	N-terminal verkürzter Formiat-Nitrit-Transporter aus <i>E. histolytica</i> von A. Gollmack	
<i>EhFNTN283H</i>	Formiat-Nitrit-Transporter aus <i>E. histolytica</i> mit Mutation an Stelle 283 von A. Gollmack	
<i>BtFdhC1</i>	Formiat-Nitrit-Transporter aus <i>B. thuringiensis</i> 2854446 Gen aus YWC2-8 Stamm	31628979
<i>PfFNT</i>	Formiat-Nitrit-Transporter aus <i>P. falciparum</i>	814480
<i>EcFocA</i>	Formiat-Nitrit-Transporter aus <i>E. coli</i>	945513

2.5 Oligonukleotide (primer)

Bezeichnung	Sequenz	Zweck
pIVEX2.3_oHA-Sequ_as	CAG CCA ACT CAG CTT CCT TT	Sequenzierprimer, as

2.6 *E. coli*-Stämme

Name	Genotyp
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB(rB⁻, mB⁻) gal dcm</i> (DE3)
DH5α	F ⁻ <i>φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1</i>

2.7 *S. cerevisiae*-Stämme

Name	Genotyp	Quelle
W303-1A <i>Δjen1 Δady2</i>	<i>Δjen1 Δady2</i> (MATa, <i>can1-100, ade2-1oc, his3-11-15, leu2-3,-112, trp1-1-1, ura3-1, jen1::kanMX4, ady2::hphMX4</i>)	M. Casal
NY17	MATa, <i>sec6-4, ura3-52</i>	A. Gollmack

2.8 Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung
Anti-Penta-His	monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen 5 x Histidin gerichtet (Qiagen N.V.)	1 : 5000 in MTBST
Anti-Hämagglutinin/ Anti-HA 12CA5	monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen Aminosäuresequenz YPYDVPDYA gerichtet (Hoffmann-La Roche AG)	1 : 5000 in MTBST
Anti-T7 RNAP	monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen T7-RNA-Polymerase gerichtet (Novagen®)	1 : 5000 in MTBST
Anti-Maus (Sekundärantikörper)	polyklonaler Antikörper aus der Ziege gegen die leichte Seitenkette des Maus-Immunglobulin G gerichtet, Meerrettich-Peroxidase konjugiert; (Jackson ImmunoResearch Ltd.)	1 : 5000 in MTBST

2.9 Puffer, Medien und Lösungen

2.9.1 Molekularbiologie

Alle in diesem Kapitel aufgeführten Nährmedien wurden nach der Herstellung autoklaviert. Angegebene Konzentrationen beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf Lösungen in *Aqua bidest.*

Agarose-Gel Elektrophorese

TAE-Puffer

40 mM TRIS-Acetat
1 mM EDTA
auf pH 6,8 eingestellt

Ethidiumbromid (10 mg ml⁻¹)

1 Tablette Ethidiumbromid
10 ml *Aqua bidest.*

10 x Probenpuffer (Orange G):

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

***E. coli*-Medien**

LB-Medium

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

ggf. Ampicillin 100 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 D-Glukose
ad 1 l *Aqua bidest.*

YPD-Agar

20 g Oxoid Agar
1 l YPD-Medium

YP(0,2%)D-Medium

20 g Pepton
10 g Hefeextrakt
2 g D-Glukose
ad 1 l *Aqua bidest.*

SD-Medium

1,7 g YNB
5 g Ammoniumsulfat
20 g D-Glukose
Ad 1 l *Aqua bidest.*, pH 5,6

SD-Platten

20 g Oxoid Agar
1 l SD-Medium

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
5 mM EDTA
auf pH 7,5 eingestellt

Puffer M

100 mM Natriumphosphat
50 mM Natriumchlorid
auf pH 8,0 eingestellt

Isolierung der sekretorischen Vesikel aus NY17-*S. cerevisiae*

Spheronisierungspuffer

1,2 M D-Sorbitol
10 mM Natriumazid
2 mM EDTA
40 mM β -Mercaptoethanol
20 mM HEPES
20 mM TRIS
auf pH 7,5 eingestellt

Vesikelpuffer

250 mM Saccharose
20 mM Kaliumchlorid
10 mM HEPES
10 mM TRIS
auf pH 7,5 eingestellt

SDS-PAGE

Sammelgelpuffer 4 x

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

Trenngelpuffer 4 x

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

SDS-Ladepuffer 4 x

250 mM TRIS-HCl
40 % Glycerol
0,02 % Bromphenolblau
8 % SDS
400 mM DDT
auf pH 8,0 eingestellt

Kathodenpuffer

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

Coomassie-Färbelösung

600 ml Rotiphorese®-Blau R
397,5 ml *Aqua bidest.*

Entfärbelösung

10 % Eisessig
30 % Ethanol

Western Blot

Transferpuffer 5 x

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

TBST

100 ml TBS 10 x
 1 ml Tween® 20
 Ad 1 l *Aqua bidest.*

TBS 10 x

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

MTBST

3 % Milchpulver in TBST

TCA-Fällung

PBS-Puffer

137 mM Natriumchlorid
 2,7 mM Kaliumchlorid
 10 mM NaH₂PO₄
 2 mM KH₂PO₄
 auf pH 7,4 eingestellt

2.9.3 ¹⁴C-Substrataufnahmeassay

Messpuffer

50 mM HEPES
 50 mM TRIS
 auf pH 6,8 eingestellt

Substratpuffer

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

2.9.4 Zellfreie Proteinherstellung

S30-Puffer

10 mM TRIS-Acetat
 14 mM Magnesiumacetat
 0,6 mM Kaliumacetat
 auf pH 8,2 eingestellt

Aminosäuremix

4 mM Jeder Aminosäure

HEPES-EDTA-Puffer

2,5 M HEPES
 0,5 M EDTA
 auf pH 8,0 eingestellt

***E.coli*-S30-Extrakt**

S30-Puffer A

10 mM TRIS-Acetat
 14 mM Magnesiumacetat
 0,6 mM Kaliumacetat
 6 mM β -Mercaptoethanol
 auf pH 8,2 eingestellt

S30-Puffer C

10 mM TRIS-Acetat
 14 mM Magnesiumacetat
 0,6 mM Kaliumacetat
 0,5 mM DTT
 auf pH 8,2 eingestellt

Reinigungspuffer

20 mM TRIS-HCl
 150 mM Natriumchlorid
 Detergens (i.d.R. Brij® 78 0,05%)
 auf pH 8,0 eingestellt

RWCMDE

16,7 mM Jeweils von RWCMDE

NTP-Mix

360 mM ATP
 Je 240 mM CTP, GTP und UTP

S30-Puffer B

10 mM TRIS-Acetat
 14 mM Magnesiumacetat
 0,6 mM Kaliumacetat
 1 mM DTT
 auf pH 8,2 eingestellt

2 x YTPG-Medium

14,95 g KH_2PO_4
 45,65 g K_2HPO_4
 50 g Hefeextrakt
 80 g Bactotrypton
 25 g Natriumchlorid
 99 g D-Glukose
 500 μl Antifoam Y-30
 ad 5 l *Aqua bidest.*
 pH 7,0 (nicht eingestellt)

T7-RNA-Polymerase

T7-Puffer I

30 mM TRIS-HCl
 10 mM EDTA
 50 mM Natriumchlorid
 5 % Glycerol
 10 mM β -Mercaptoethanol
 auf pH 8,0 eingestellt

T7-Puffer II

30 mM TRIS-HCl
 10 mM EDTA
 20 mM Natriumchlorid
 5 % Glycerol
 10 mM β -Mercaptoethanol
 auf pH 8,0 eingestellt

T7-Dialysepuffer

10 mM TRIS-HCl
 1 mM EDTA
 10 mM Natriumchlorid
 1 mM DTT
 auf pH 8,0 eingestellt

2.9.5 Liposomen

Liposomen-Puffer I

20 mM HEPES
 auf pH 6,8 eingestellt

Liposomen-Puffer II

5 mM HEPES
 5 mM MES
 200 mM Saccharose
 100 mM Kaliumchlorid
 auf pH 6,8 eingestellt

Gradientenlösung I

20 mM HEPES
 40 mM Acetat, Formiat oder
 L-Laktat als Natriumsalze
 auf pH 6,8 eingestellt

Gradientenlösung II

5 mM HEPES
 5 mM MES
 200 mM Saccharose
 100 mM Kaliumchlorid
 400 mM Acetat, Formiat oder
 L-Laktat als Natriumsalze
 auf pH 4,4, pH 6,8, pH 9,2 eingestellt

CCCP-Stammlösung

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

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

Alle Inkubationen von Zellen bei Temperaturen über 4 °C wurden unter horizontaler oder vertikaler Rotation bei 200 U min⁻¹ durchgeführt.

3.1.1 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese wurde für die Auftrennung, Konzentrationsabschätzung und Isolierung von DNA-Fragmenten verwendet. Das flüssige Agarosegel wurde wie folgt hergestellt. 1 % Agarose wurde in 50 ml TAE-Puffer durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und anschließend mit 1 µl Ethidiumbromid (10 mg ml⁻¹) versetzt. Letzteres diente der DNA-Detektion durch Interkalation mittels Fluoreszenzanalyse bei einer Anregungswellenlänge von 366 nm. Nach dem Gießen und dem Erstarren des Gels wurde dieses in eine Laufkammer mit TAE-Puffer überführt, die DNA-Proben 1 : 10 mit Ladepuffer gemischt und bis zu 20 µl pro Probentasche einpipettiert. Als Größenmarker wurde *Pst*I geschnittene λ-DNA in eine Tasche gegeben (Abbildung 3.1), um eine spätere Größenordnung zu ermöglichen. Außerdem ermöglichte ein Vergleich der Bandenintensitäten mit den Marker-Banden eine DNA-Konzentrationsabschätzung (Größenmarker mit 0,5 µg µl⁻¹ DNA). Es wurde sodann eine Spannung von 120 V angelegt und die DNA-Fragmente elektrophoretisch über 30-60 min ihrer Größe entsprechend getrennt.

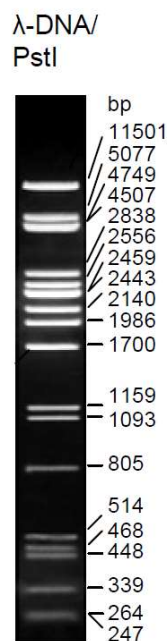


Abbildung 3.1: DNA-Größenmarker für die Agarose-Gel-Elektrophorese aus *Pst* I verdauter λ-DNA. (1 µg in 1,5 % Agarosegel)

3.1.2 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden visuell detektiert und manuell mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Aus den erhaltenen Gelfragmenten wurde unter Verwendung des Hi Yield® *Gel / PCR DNA Fragment Extraction Kits* die von Agarose, Ethidiumbromid und Salzen gereinigte DNA extrahiert und in 10-25 µl *Aqua bidest.* eluiert.

3.1.3 DNA-Plasmid-Isolierung aus Bakterien

Die Plasmidisolierung aus *E. coli*-Kulturen erfolgte in Abhängigkeit der Kulturgröße mit dem Wizard® *Plus SV Minipreps DNA Purification System* für kleine DNA-Mengen (Minipräparation) aus 5 ml LB-Amp-Medium-Kulturen oder dem NucleoBond PC 500-Kit für große DNA-Mengen (Maxipräparation) aus 250 ml LB-Amp-Medium-Kulturen. Für die DNA-Gewinnung wurde ein Klon in 5 ml des Selektionsmediums überführt und je nach Kulturgröße 8-12 h bei 37 °C inkubiert.

Für die Minipräparation wurde nach 10-12h Inkubation weiter nach der Anleitung des Herstellers verfahren, wobei folgende Arbeitsschritte im Protokoll angepasst wurden: Es wurde keine alkalische Protease zugegeben und die Elution der DNA erfolgte mit 50 µl *Aqua bidest.* statt mit 100 µl.

Für die Maxipräparation wurde die 5 ml-Kultur nach 8 h Inkubation in 250 ml LB-Amp-Medium überführt und weitere 10-12 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde nach Anleitung des Herstellers verfahren und die erhaltene DNA nach dem Trocknen in 50-100 µl *Aqua bidest.* gelöst.

3.1.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Um dsDNA bei Klonierungsarbeiten und Transformationen effektiv nutzen zu können, wurden die DNA-Konzentrationen an einem BioPhotometer (Innova 535) über Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt und wie folgt berechnet:

$$c \text{ (}\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}\text{)} = A_{260} \cdot 50 \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

Das Verhältnis von A_{260} zu A_{280} wurde als Maß für die Reinheit genutzt, da durch Absorptionsmessung bei 280 nm die aromatischen Aminosäuren in Proteinen erfasst werden. Ab einem Verhältnis A_{260} / A_{280} von 1,8-2,0 wurde die Reinheit als gut erachtet und die DNA für weitere Arbeiten genutzt.

3.1.5 Restriktionsverdau

1 µg DNA wurde mit je 1 µl entsprechenden Restriktionsenzymen einer Konzentration von 5-8 U µg⁻¹ DNA und 1-2 µl des vom Hersteller vorgegebenen Puffers versetzt, auf 10 µl mit *Aqua bidest.* aufgefüllt und 2-3 h bei 37 °C inkubiert.

3.1.6 Ligation

Die Ligation von kompatiblen DNA-Fragmenten wurde unter Verwendung von T4-DNA-Ligase im vom Hersteller empfohlenen Puffer für 30 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Verhältnis von Insert zu Vektor betrug etwa drei zu eins.

3.1.7 Transformation von *E. coli*

Der Ligationsansatz mit den ligierten Plasmiden wurde auf 100 µl angetaute, chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (3.1.14) pipettiert, welche anschließend für 30 min auf Eis inkubiert wurden. Nach einem 30-sekündigen Hitzeschock bei 42 °C wurden die Zellen weitere 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 900 µl LB-Medium hinzugefügt und der Ansatz für 60 min bei 37 °C inkubiert. Nach einminütiger Zentrifugation bei 13.000 g wurden 900 µl Überstand verworfen und das Pellet in den 100 µl verbliebenen Überstand resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde auf einer LB-Amp-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.8 Schnelltransformation von *E. coli*

DNA, die bei einer Mini- oder Maxipräparation gewonnen wurde, wird von kompetenten *E. coli*-Zellen effektiv aufgenommen, was den Transformationsaufwand verringert. Zur Transformation wurden 0,2 µl DNA auf 100 µl angetaute, chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (3.1.14) pipettiert, welche anschließend 15 min auf Eis inkubiert wurden. 40 µl der Zellsuspension wurden entnommen und auf LB-Amp-Agarplatten ausgestrichen, welche über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden.

3.1.9 Transformation von *S. cerevisiae*

Transformationen von *S. cerevisiae*-Stämmen erfolgte nach der Lithium-Acetat-Methode (73). Dafür wurden 5 ml YPD-Medium mit einer einzelnen Kolonie des entsprechenden Stammes inokuliert und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Vorkultur genutzt, um eine 50 ml YPD-Hauptkultur mit einem Start-OD₆₀₀-Wert von 0,2 zu erzeugen. Nach 2-5 h Inkubation bei 28 °C betrug die OD₆₀₀ etwa 0,6 und die Zellen wurden bei 2.000 g für 5 min abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde erst mit 25 ml *Aqua bidest.* gewaschen und dann mit 1 ml *Aqua bidest.* resuspendiert. 100 µl der erhaltenen Zellsuspension wurden vorgelegt, 240 µl PEG 3500 50 %, 36 µl Lithiumacetat 1 M, 50 µl sscDNA, 33 µl *Aqua bidest.* und 1 µl Plasmid-DNA hinzu pipettiert und gemischt. Die eingesetzte sscDNA (*single stranded carrier DNA*) ist denaturierte DNA aus Lachssperma. Sie wurde durch Erhitzen für 5 min bei 95 °C für die Transformation vorbereitet und anschließend auf Eis gelagert. Nach 45-60 min Inkubation bei 42 °C wurde für 20 s bei 13.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml *Aqua bidest.* resuspendiert, erneut 1 : 10 verdünnt und 100 µl der Zellsuspension auf einer SD-AHLW-Agarplatte ausgestrichen. Das Medium erlaubte eine Selektion der Zellen, die Plasmide mit dem Orotidin-5'-phosphatdecarboxylase-Gen (*URA3*, z.B. in pDRTXa-Vektor) aufgenommen haben. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und 4-5 Tage bei 29 °C inkubiert.

3.1.10 Isolierung von sekretorischen Vesikeln aus NY17-*S. cerevisiae*

Die Herstellung von sekretorischen Vesikeln aus NY17-Hefezellen erfolgte nach dem Protokoll von Peter Novick (74). Zur Gewinnung von NY17-Hefezellen mit angereicherten sekretorischen Vesikeln wurde von einer SD-Platte eine Kolonie in 5 ml SD-Medium überführt und bei 30 °C und 200 rpm Rotation über Nacht inkubiert. Ein entsprechendes Volumen dieser Kultur wurde am nächsten Morgen zu 200 ml YPD-Medium gegeben, so dass eine Start-OD₆₀₀ von 0,08 bis 0,09 gemessen wurde. Dieses Medium wurde über Nacht bei 25 °C und 200 rpm bis zu einer Ziel-OD₆₀₀ von 2,0 inkubiert. Die Zellsuspension wurde bei 3.000 g für 10 min abzentrifugiert und in 200 ml YP(0,2 %)D-Medium resuspendiert und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden bei 7.500 g für 10 min abzentrifugiert und zweimal mit 10 ml 10 mM eiskalter Natriumazid-Lösung gewaschen und das Pellet anschließend bei -80 °C bis zum späteren Aufschluss gelagert.

Die aufgetauten Zellpellets wurden mit 25 ml 100 mM TRIS-Acetat (pH 9,4) und 40 mM β-Mercaptoethanol resuspendiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 3.000 g für 10 min abzentrifugiert und in 25 ml Spheronisierungspuffer (0) resuspendiert und mit 3,75 g säuregewaschenen *glass beads* versetzt. Die Zellyse erfolgte mechanisch durch abwechselnd 1 min Vortexen und 3 min Inkubation auf Eis für insgesamt 5 Zyklen. Der Gesamtzellaufschluss wurde erneut bei 10.000 g für 10 min zentrifugiert, um das Zelllysate im Überstand von unlysierten Zellen, großen Zelltrümmern und den *glass beads* im Pellet zu trennen. Der Überstand wurde bei 100.000 g für 45 min zentrifugiert, das dabei erhaltene Pellet mit 25 ml Vesikelpuffer (0) gewaschen und erneut bei denselben Bedingungen zentrifugiert. Das letztlich entstandene Pellet enthält die sekretorischen Vesikel und wurde in 5 ml Vesikelpuffer resuspendiert und bei 4 °C für maximal 5 Tage gelagert.

3.1.11 Dauerkulturen von *E. coli*

Dauerkulturen von transformierten *E. coli*-Zellen wurden aus 500 µl einer Übernachtskultur hergestellt. Dafür wurden 500 µl Glycerol 80 % zugefügt, gemischt und bei -80 °C gelagert.

3.1.12 Dauerkulturen von *S. cerevisiae*

Dauerkulturen von transformierten *S. cerevisiae*-Zellen wurden aus 500 µl einer Übernachtskultur hergestellt. Dafür wurden 500 µl Glycerol 80 % zugefügt, gemischt und bei -80 °C gelagert.

3.1.13 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungs-PCR wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruchreaktionsmethode nach Sanger durchgeführt (75). Dafür wurde das Genome™ Lab DTCS *Quick Start Kit* verwendet. 50-100 fmol DNA-*template* wurden mit *Aqua bidest.* auf 9,5 µl aufgefüllt und für 5 min bei 86 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl DTCS *Quick Start Master Mix* und 1,5 µl Sequenzier-*primer* (5 µM) zugefügt, gemischt und das Temperaturprogramm wurde gestartet (siehe Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Temperaturprogramm für Sequenzierungsreaktion.

Temperatur	Dauer	Prozessschritt
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

Anschließend wurde mit einer Stopplösung aus 3 µl 3 M Natriumacetat, 2 µl 100 mM Natrium-EDTA und 1 µl Glykogen (20 mg ml⁻¹) die Sequenzierungsreaktion beendet. Dann wurde mit 60 µl gekühltem 96%igen Ethanol die DNA gefällt und bei 14.000 g und 4 °C abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde zweimal mit 200 µl gekühltem 70%igen Ethanol gewaschen, wobei die Zentrifugationsschritte bei 5 min bei gleichbleibenden Bedingungen durchgeführt wurden. Das resultierende DNA-Pellet wurde in der Vakuumzentrifuge bei Raumtemperatur für 30 min getrocknet und mit 20-30 µl *sample loading solution* resuspendiert. Die Kapillarelektrophorese der DNA-Fragmente erfolgte am Beckman DNA Sequencer CEQ™ 8000 mit GenomeLab™ Separationskapillaren.

3.1.14 Herstellung kompetenter *E. coli*

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach der Calciumchlorid-Methode (76) hergestellt. DH5α *E. coli*-Zellen wurde auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 5 ml LB-Flüssigmedium mit einer Kolonie inokuliert und für 8-10 h bei 35 °C inkubiert und diese Vorkultur anschließend in 100 ml LB-Medium überführt (Hauptkultur). Nach 8-12 h Inkubation bei 20 °C wurde ein OD₆₀₀-Wert von 0,4-0,6 erreicht und die Zellsuspension für 10 min auf Eis gelagert. Nach Zentrifugation bei 2.000 g für 10 min bei 4 °C wurde das Zellpellet in 15 ml kalter, 0,1 M Calciumchlorid-Lösung resuspendiert und erneut für 10 min auf Eis gelagert. Dieser Arbeitsschritt wurde noch einmal mit 10 ml der Calciumchlorid-Lösung und mit 5 ml 0,1 M Calciumchlorid-Lösung mit 20 % Glycerol wiederholt. Die Zellsuspension wurde anschließend für 4 h auf Eis inkubiert und in 100 µl Aliquote aufgeteilt bei -80 °C gelagert.

3.2 Proteinchemische Methoden

3.2.1 Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus *S. cerevisiae*-Zellen erfolgte durch differentiale Zentrifugation nach mechanischer Homogenisierung der Zellen. 100 ml Hefekultur wurde dafür auf einen OD₆₀₀-Wert von 0,8-1,0 gezüchtet und die erhaltene Zellsuspension für 5 min bei 4 °C und 2.000 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde daraufhin erst mit 50 ml 4 °C kaltem *Aqua bidest.* und anschließend mit 10 ml 4 °C kaltem Puffer B gewaschen und für mindestens 1 h bei -80 °C gelagert. Die aufgetaute Hefezellsuspension wurde mit 500 µl 50%iger Suspension säuregewaschener *glass beads* und 500 µl Puffer B versetzt. Die Zellen

wurden 30 s gevortext und 1 min auf Eis gekühlt. Dieser Arbeitsschritt wurde 15-mal wiederholt, um die Zellen mechanisch zu homogenisieren. Das Gesamtzelllysat wurde durch Zentrifugation bei 1.000 g für 5 min in große Zelltrümmer mit *glass beads* im Pellet und restliche Bestandteile im Überstand aufgetrennt. Das entstandene Pellet wurde mit 500 µl Puffer B gewaschen, bei gleichen Bedingungen zentrifugiert und die Überstände der letzten beiden Arbeitsschritte vereinigt. Anschließend wurde erneut für 5 min bei 1.000 g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde 40 min bei 100.000 g zentrifugiert um die mikrosomale Fraktion im Pellet zu erhalten. Letzteres wurde in 100 µl Puffer M zu einer Proteinkonzentration von mindestens 5 µg/µl resuspendiert, mit 100 µl SDS-Ladepuffer 4x und 200 µl *Aqua bidest.* versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die erhaltenen Proben für eine spätere SDS-PAGE (3.2.3) wurden bei –20 °C gelagert.

3.2.2 Proteinquantifizierung

Die Proteinquantifizierung erfolgte nach der Methode von Marion M. Bradford (77). Für die Untersuchung wurde das Bio-Rad QuickStart™ Bradford *Protein Assay Kit* benutzt. 792-798 µl *Aqua bidest.* wurden mit 2-8 µl Proteinlösung und 200 µl Bradford-Reagenz gemischt und nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur bei 595 nm die Absorption bestimmt. Bei der Negativkontrolle wurde die Proteinlösung durch *Aqua bidest.* ersetzt.

3.2.3 *Sodium dodecylsulfate*-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinproben wurden mithilfe einer diskontinuierlichen SDS-PAGE entsprechend ihrer Größe aufgetrennt (78). Dafür wurden 5%ige Polyacrylamid-Sammel- und 12,5%ige Trenngele genutzt, die sich zwischen einer Glas- und einer Keramikplatte befanden. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung Polyacrylamid-Gele.

Sammelgel 5 %		Trenngel 12,5 %	
<i>Aqua bidest.</i>	2,4 ml	<i>Aqua bidest</i>	5,25 ml
Sammelgelpuffer 4 x	1 ml	Trenngelpuffer 4 x	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 4 x versetzt, 30 min bei 37 °C inkubiert und bei –20 °C gelagert. Das negativ geladene Natriumlaurylsulfat (*sodium dodecylsulfate*, SDS) lagerte sich an die Proteinmoleküle an, denaturiert sie und ermöglichte dadurch eine größenabhängige Wanderung im elektrischen Feld in Richtung Anode. Die Größenermittlung erfolgte durch den Vergleich zu Banden des eingesetzten PeqGold *prestained Protein Marker III* mit definierten Proteingrößen. Bei 160 V wurden zunächst die Proteine im Sammelgel konzentriert und anschließend bei 200 V im Trenngel aufgetrennt. Die Trenngele wurden anschließend fluorimetrisch am Lumi-Imager F1™ untersucht (0), mit Coomassie-Färbelösung gefärbt (3.2.4) oder mit einem Western Blot analysiert (3.2.5).

3.2.4 Polyacrylamid-Gelfärbung mit Coomassie

Für die unselektive Färbung von Proteinen wurde das Gel mindestens 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln mit 15 ml Coomassie-Färbelösung (Rotiphorese® Blau R) versetzt und anschließend bis zur Entfärbung des Hintergrunds bei gleichen Bedingungen mit Entfärbelösung inkubiert. Das gefärbte Gel wurde zwischen zwei transparenten Folien mit einem handelsüblichen Scanner eingescannt.

3.2.5 Western Blot

Mithilfe der *semi-dry*-Methode des Western Blot-Verfahrens (79) wurden die im SDS-PAGE-Gel getrennten Proteine durch Anlegen einer Spannung vom SDS-PAGE-Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Die PVDF-Membran wurde für 30 s in Methanol aktiviert und anschließend zusammen mit Whatman® *chromatography paper* in Transferpuffer für 5 min inkubiert. Das Gel wurde auf die Membran gelegt und beide zusammen auf Ober- und Unterseite mit je 3 feuchten Whatman®-Papieren abgedeckt. Dieses Paket wurde zwischen die beiden Elektroden der *blotting*-Apparatur gelegt und der Elektrotransfer der Proteine erfolgte nach Anlegung der Spannung von 17 V über 60 min.

Daraufhin wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in MTBST inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für Antikörper zu blockieren. Danach wurde die Membran in 15 ml primärantikörperhaltiges MTBST überführt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Vor und nach der anschließenden Inkubation des Sekundärantikörpers wurde dreimal 10 s und dreimal 15 s mit 10 ml TBST gewaschen. Die Inkubation der Membran in 15 ml sekundärantikörperhaltigem MTBST wurde für 1-2 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Der Nachweis des gebundenen Sekundärantikörpers mittels Chemilumineszenz-Reaktion mit dem Amersham™ ECL Plus Reagenzkits wurde am Lumi-Imager® durchgeführt und ausgewertet.

3.3 Zellfreie Proteinherstellung

Die folgenden Arbeitsschritte sowie die Herstellung der nötigen Bestandteile zur zellfreien Proteinherstellung mit dem *Continuous-Exchange-Cell-Free-System* (CECF-System) wurden nach dem Protokoll von Schwarz *et al.* (80) durchgeführt und durch Dr. Annika Müller-Lucks, Dr. Sinja Bock und Dr. Julia Holm-Bertelsen in unserem Labor etabliert (81, 40). Dabei wurde die zellfreie Proteinherstellung über einen Zeitraum von bis zu 24 h durch einen speziellen Aufbau ermöglicht. Der *reaction mixture* (RM), in dem die Transkription und Translation von DNA zum Protein stattfand, war dabei über eine semipermeable Membran mit einem großen Volumen, dem *feeding mixture* (FM), verbunden.

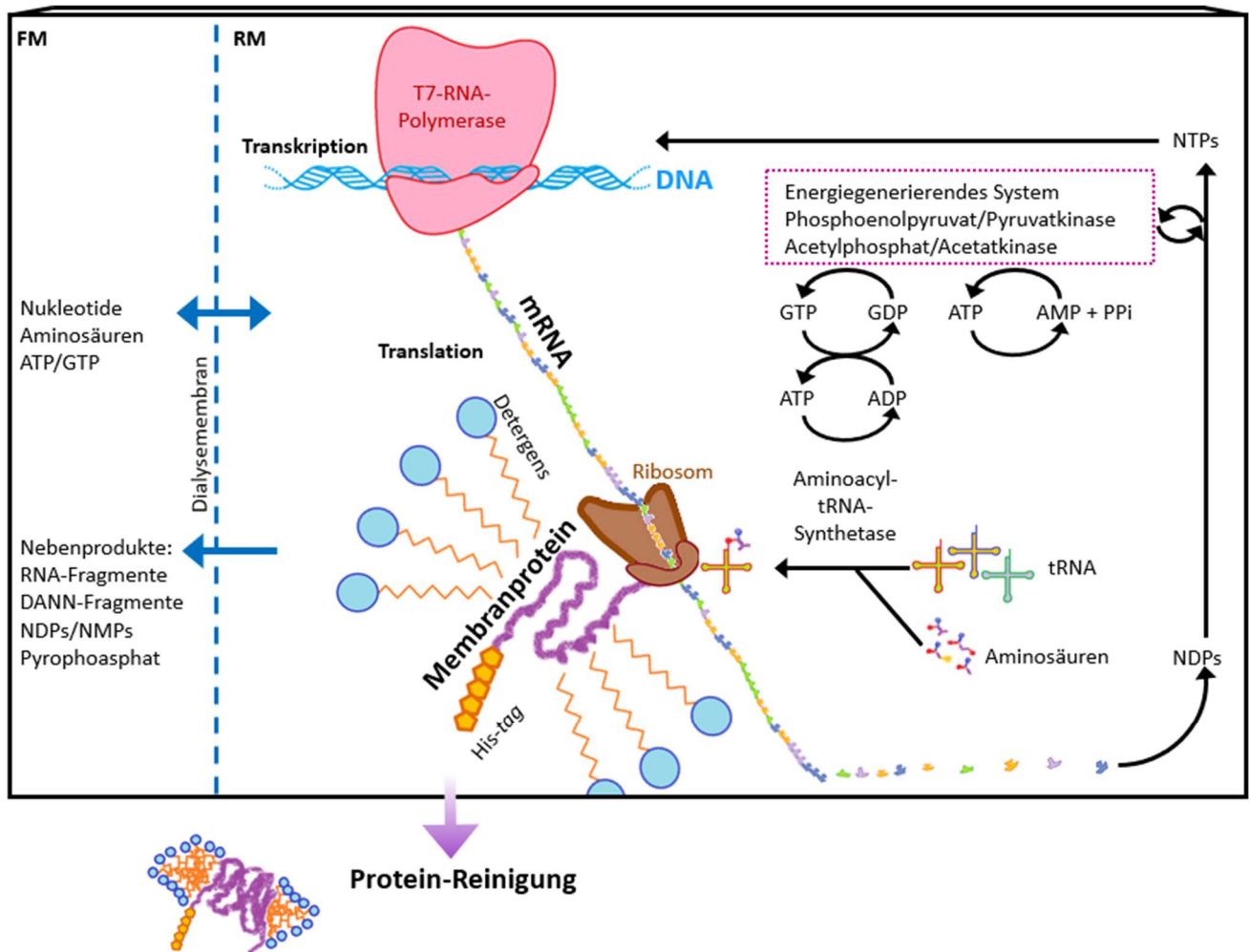


Abbildung 3.2: Schema der zellfreien Membranproteinherstellung mit dem *Continuous-Exchange-Cell-Free-System* (CECF-System). Die Dialysemembran trennt den *feeding mixture* (FM) vom *reaction mixture* (RM) (nicht maßstabsgetreu dargestellt). Im RM findet die Transkription der DNA zu mRNA und die Translation aus mRNA und tRNA zum Protein statt. Das Membranprotein (dargestellt mit N-terminalen His-tag) wird durch Einlagerung in Mizellen stabilisiert und in anschließenden Arbeitsschritten gereinigt. Energieliefernde Systeme und der Stoffaustausch zwischen FM und RM ermöglichen für bis zu 24 h eine kontinuierliche Reaktion mit hohen Proteinausbeuten. Abbildung modifiziert nach (80).

3.3.1 Gewinnung eines S30-Extrakts aus *E. coli*

Um die zellfreie Proteinherstellung mit dem CECF-System durchzuführen, wurden die benötigten Transkriptions- und Translationsfaktoren aus einem 5-Liter-Ansatz von BL21(DE3) *E. coli*-Zellen gewonnen. Der resultierende Zellextrakt wird im Folgenden S30-Extrakt genannt (80).

Die *E. coli*-Zellen wurden dafür auf LB-Platten ausgestrichen und eine gebildete Kolonie genutzt, um 50 ml LB-Medium zu inokulieren. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 200 U min⁻¹ inkubiert und am nächsten Tag genutzt, um 5 l Medium im Fermenter zu

beimpfen. Dafür wurden alle Bestandteile für zweifaches YPTG-Medium mit Ausnahme von Antifoam Y 30, der Glukose-Lösung und der Phosphatpufferbestandteile in 4,5 l *Aqua bidest.* gelöst und im Fermenter autoklaviert. Die Phosphatpufferbestandteile wurden in 250 ml *Aqua bidest.* gelöst und separat autoklaviert, die Glukose in 500 ml *Aqua bidest.* gelöst und steril filtriert. Nach dem Vereinigen aller zweifachen YPTG-Medium-Bestandteile im Fermenter wurden 500 µl Antifoam Y-30 sowie die gesamte Vorkultur zugefügt. Die *E. coli*-Zellen wurden anschließend bis zur exponentiellen Wachstumsphase (OD₆₀₀ von 2,5-3) bei 37 °C und 80%iger Sauerstoffsättigung kultiviert. Der Sauerstoffgehalt und die OD₆₀₀ wurden während des Prozesses regelmäßig kontrolliert.

Bei Erreichen der Ziel-OD₆₀₀ wurde durch rasches Abkühlen auf unter 14 °C das Zellwachstum gestoppt. Durch Zentrifugation bei 4.500 g für 15 min bei 4 °C wurden die Zellen geerntet, dreimal mit je 150 ml 4 °C kalten S30-Puffer-A gewaschen und bei -80 °C eingefroren. Die wieder aufgetauten Zellen wurden in 110 % (V/m) 4 °C kalten S30-Puffer B resuspendiert und mit dem Hochdruck-Homogenisator *French Press cell disruptor* bei 20.000 psi aufgeschlossen. Anschließend wurde bei 30.000 g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert, wodurch sich drei erkennbare Schichten bildeten: Das Pellet mit großen Zelltrümmern, der oben aufschwimmende Lipidüberstand und der mittlere rohe S30-Extrakt. Letzterer wurde abpipettiert, der Zentrifugationsschritt wiederholt und erneut die S30-Extrakt-Fraktion entnommen. Der Extrakt wurde sodann mit 4 M NaCl auf eine finale Konzentration von 400 mM NaCl eingestellt, für 45 min bei 42 °C im bewegten Wasserbad inkubiert und über Nacht zweimal gegen 2,5 l S30-Puffer C bei 4 °C dialysiert (Membran mit 14 kDa *cut-off*). Der dialysierte Extrakt wurde erneut bei 30.000 g für 30 min zentrifugiert. Wie zuvor erläutert wurde die S30-Extrakt-Fraktion entnommen, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Qualität des S30-Extraktes wurde durch ein sogenanntes Magnesium-*Screening* unter Herstellung von GFP überprüft (3.3.3 und 0).

3.3.2 Gewinnung von T7-RNA Polymerase

Die bei der zellfreien Proteinherstellung genutzten pIVEX2.3-Plasmide enthielten eine T7-Promotorsequenz, welche nur durch T7-RNA-Polymerase erkannt wird. Diese wurde aus BL21(DE3) pAR1219 *E. coli*-Zellen gewonnen. Dafür wurden 20 ml LB-Amp-Medium mit einer Kolonie einer frisch gewachsenen LB-Amp-Platte inokuliert und diese Vorkultur über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde diese Vorkultur in 2 l LB-Amp-Medium überführt und die Zellsuspension bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 kultiviert. Durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) wurde die Expression der T7-RNA-Polymerase induziert und für weitere 5 h bebrütet. Das Zellpellet wurden durch Zentrifugation bei 4.500 g für 15 min bei 4 °C erhalten, dann mit 60 ml T7-Puffer gewaschen und bei -80 °C gelagert. Die wieder aufgetauten Zellen wurden in 30 ml T7-Puffer II resuspendiert und dreimal bei 20.000 psi in der *French Press* aufgeschlossen. Durch eine Zentrifugation bei 20.000 g für 30 min bei 4 °C wurden Zelltrümmer als Pellet entfernt und der Überstand mit zehnpromzentiger Streptomycinsulfatlösung versetzt, bis eine Konzentration von 2,0 % erreicht wurde. Die präzipitierte DNA wurde durch einen Zentrifugationsschritt bei 30.000 g für 30 min bei 4 °C als

Pellet entfernt. Die Reinigung der T7-RNA-Polymerase aus dem Überstand wurde mittels Anionenaustauschchromatographie an einer Sepharose Q-Säule realisiert. Die Säule wurde dafür mit zwei Säulenvolumen T7-Puffer II äquilibriert und anschließend die Probe aufgetragen. Danach wurde durch steigende NaCl-Konzentrationen von 20-500 mM in T7-Puffer mit dem 21-fachen Säulenvolumen die T7-RNA-Polymerase eluiert (3 ml min^{-1}) und mit 2 Säulenvolumen 1 M NaCl-haltigen T7-Puffer und 3 Säulenvolumen 20 % ethanolhaltigen T7-Puffer I nachgespült. Es wurden je 15 ml Elutionsfraktionen aufgefangen und diese bei 280 nm auf ihre Proteinkonzentration und durch Western Blot mit spezifischem Antikörper (anti-T7-RNA-Polymerase Antikörper) auf den Gehalt an T7-RNA-Polymerase untersucht. Fraktionen, die T7-RNA-Polymerase (MW = 99 kDa) enthielten, wurden vereinigt und mit Amicon *Filter Devices* mit 30 kDa *cut-off* auf 8 mg ml^{-1} Gesamtprotein konzentriert. Der Ansatz wurde dann über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gegen 1 l T7-Dialysepuffer durch eine Membran mit 14 kDa *cut-off* dialysiert. Nach der Dialyse wurde der Proteingehalt auf 4 mg ml^{-1} mit Glycerol eingestellt, so dass die finale Mischung 50 % Glycerol enthielt. Nach der Aliquotierung wurde die gewonnene T7-RNA-Polymerase bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert und ihre Aktivität durch Expression von GFP im CECF-System im analytischen Ansatz untersucht und dabei mit der Qualität einer früheren Charge verglichen.

3.3.3 Analytischer Ansatz zellfreier Proteinherstellung

Um eine zellfreie Herstellung von Membranproteinen im präparativen Maßstab (1 ml Reaktionsvolumen) mit dem CECF-System zu ermöglichen, war es nötig, die dafür geeigneten Bedingungen sowie die Qualität der selbst hergestellten Bestandteile zu testen. Für diese Aufgaben wurden analytische Ansätze des CECF-Systems im kleinen Maßstab ($55 \text{ } \mu\text{l}$ Reaktionsvolumen) genutzt. Die analytischen Ansätze wurden in selbstgebauten Reaktionsgefäßen nach dem Vorbild von Schneider *et al.* (82) durchgeführt, welche eine simultane Doppelbestimmung ermöglichten. Für die Durchführung wurden pro Ansatz $55 \text{ } \mu\text{l}$ RM und $850 \text{ } \mu\text{l}$ FM hergestellt und beide durch eine semipermeable Membran mit einem 14 kDa *cut-off* getrennt, wodurch sich ein Volumenverhältnis zwischen beiden Lösungen von 1 : 15 ergab. Die Dialysekammer wurde nach dem luftblasenfreien Beladen für bis zu 24 h im bewegten Wasserbad bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden sodann entnommen, eine Stunde auf Eis gelagert und mittels Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt (3.3.7.1). FM und RM wurden aus einem gemeinsamen Mastermix hergestellt. Durch die Zugabe weiterer spezifischer Bestandteile zum Mastermix wurden sie finalisiert. Die Konzentrationen der Komponenten sind in Tabelle 3.3 angegeben. Die Ergänzung der Bestandteile richtete sich nach der Art der zu analysierenden Problematik. Die variablen Komponenten waren das verwendete Detergens beim Detergenzien-Screening (3.3.3.2), die Magnesiumchlorid-Zugabe beim Mg^{2+} -Screening (3.3.3.1) oder die eingesetzte Charge T7-RNA-Polymerase zur Qualitätskontrolle selbiger (3.3.2). Die Konzentrationen aller Komponenten für 10 detergenzienfreie Reaktionsansätze sind in Tabelle 3.3 angegeben.

Tabelle 3.3: Komponenten, Stockkonzentrationen und eingesetzte Volumina für den analytischen Ansatz der CECF-Proteinherstellung bei 10 mM Mg²⁺-Konzentration.

Komponente	Konzentration des Stocks	Mastermix	FM	RM
		Volumen (µl)	Volumen (µl)	Volumen (µl)
S30-Puffer	1 x		3.308,0	
RWCMDE	16,67 mM	609,9		
Aminosäure-Mix	4 mM	1.270,6	1.299,0	
Acetylphosphat	1.000 mM	203,3		
Phosphoenolpyruvat	1.000 mM	203,3		
NTP-Mix	75 x	135,5		
DTT	500 mM	40,7		
Folsäure	10 mg ml ⁻¹	101,7		
cOmlplete®	50 x	203,3		
Protease-Inhibitor				
Puffer (HEPES-EDTA)	24 x	372,7		
Magnesiumacetat	1.000 mM	92,5		
Kaliumacetat	4.000 mM	330,4		
PEG 8000	40 %	508,3		
NaN ₃	10 %	50,8		
S30-Extrakt	1 x			250,0
Plasmid-DNA	0,3 mg ml ⁻¹			53,6
RNAse-Inhibitor (RiboLock®)	40 U µl ⁻¹			5,4
T7-RNA-Polymerase	4 mg ml ⁻¹			30,6
<i>E. coli</i> -tRNA	40 mg ml ⁻¹			12,5
Pyruvatkinase	10 mg ml ⁻¹			5,7
Mastermix			3.833,0	290,0
	Gesamt:	4.123,0	8.440,0	647,8

3.3.3.1 Magnesium-Screening und Qualitätskontrolle von T7-RNA-Polymerase

Die in Tabelle 3.3 angegebenen Mischungen konnten ohne weitere Detergens-Zugabe für die Herstellung von GFP (grün fluoreszierendem Protein) genutzt werden. Die Effektivität der GFP-Herstellung mit dem CECF-System wurde im *Magnesium-Screening* unter Variation der Magnesium-Konzentration und der Qualitätskontrolle der T7-RNA-Polymerase unter Variation der eingesetzten T7-RNA-Polymerase-Charge analysiert.

3.3.3.2 Detergenzien-Screening für die Proteinherstellung

Für das Detergenzien-*Screening* wurde die Tabelle 3.3 um die Zugabe des zu untersuchenden Detergens in der gewünschten Konzentration erweitert, um die Herstellungseffizienz eines FNT-GFP-Fusionsproteins zu analysieren. Nachdem die optimalen Bedingungen für die zellfreie Herstellung eines Membranproteins gefunden wurden, konnte das *scale-up* vom analytischen Ansatz (55 µl RM) zum präparativen Ansatz (1 ml RM) erfolgen. Die sowohl im analytischen als auch im präparativen Ansatz eingesetzten Detergenzien und ihre Konzentrationen sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst. Die verwendeten Polyalkylenglycoether wurden dabei mit ihren handelsüblichen Bezeichnung Brij® 35, Brij® 58, Brij® 78 und Brij® 98 angegeben.

Tabelle 3.4: Kritische Mizellbildungskonzentrationen (CMC) und Detergenzienkonzentrationen im CECF-System.

Detergens	CMC (%)	Eingesetzte Konzentration (%)
Brij® 35	0,011	0,2
Brij® 58	0,0086	1,5
Brij® 78	0,005	1,0
Brij® 98	0,0029	0,2
Digitonin	0,089	0,4

3.3.4 Präparativer Ansatz zellfreier Proteinherstellung

Die im analytischen 55 µl-Ansatz ermittelten optimalen Bedingungen für die zellfreie Herstellung von Membranproteinen im CECF-System wurden für den präparativen 1 ml-Ansatz genutzt, um in Mizellen eingelagertes, sehr wahrscheinlich korrekt gefaltetes Membranprotein in mg-Mengen zu erhalten. Dafür wurde 1 ml RM in eine Slide-A-Lyzer-Dialysekassette überführt, welche vom FM umspült wurde. Der FM befand sich dafür in einer nach dem Vorbild von Schneider *et al.* (82) selbst hergestellten Kammer. Diese wurde bei 30 °C im bewegten Wasserbad für bis zu 24 h inkubiert. Das Verhältnis von RM zu FM betrug im präparativen Ansatz 1 : 17, wobei sich das Verhältnis der Mischungsbestandteile untereinander nicht änderte, mit Ausnahme von Magnesiumchlorid, das je nach Ergebnis des Mg^{2+} -*Screenings* des eingesetzten S30-Extraktes in Konzentrationen von 12-16 mM eingesetzt wurde (Tabelle 3.5, 12 mM Mg^{2+} -Konzentration abgebildet). Nach der Inkubation wurde das erhaltene Protein mittels Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt (3.3.7.1).

3.3.4.1 Reinigungsdetergenzien-Screening

Um zu untersuchen, ob ein erfolgreich zellfrei hergestelltes Membranprotein in Anwesenheit eines bestimmten Detergens eine erhöhte Stabilität zeigt, wurde ausgehend von einem präparativen Ansatz des Ziel-Proteins ein Reinigungsdetergenzien-Screening durchgeführt. Dafür wurden je ein Drittel des Ansatzes einer Nickel-Affinitätschromatographie unterzogen (3.3.7.1), wobei während der Elution unterschiedliche Detergenzien im Reinigungspuffer zum Einsatz kamen (Tabelle 3.6). Die Auswertung erfolgte mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Gel-Färbung (3.2.4) oder Western Blot-Analyse (3.2.5).

Tabelle 3.5: Komponenten, Stockkonzentrationen und eingesetzte Volumina für den präparativen Ansatz der CECF-Proteinherstellung.

Komponente	Konzentration des Stocks	Mastermix	FM	RM
		Volumen (µl)	Volumen (µl)	Volumen (µl)
S30-Puffer	1 x		5.950,0	
Brij® 78	15 %	1.200,0		
RWCMDE	16,67 mM	1.080,0		
Aminosäure-Mix	4 mM	2.250,0	2.338,0	
Acetylphosphat	1.000 mM	360,0		
Phosphoenolpyruvat	1.000 mM	360,0		
NTP-Mix	75 x	240,0		
DTT	500 mM	72,0		
Folsäure	10 mg ml ⁻¹	180,0		
cOmplete® Protease-Inhibitor	50 x	360,0		
Puffer (HEPES-EDTA)	24 x	660,0		
Magnesiumacetat	1.000 mM	163,8		
Kaliumacetat	4.000 mM	585,0		
PEG 8000	40 %	900,0		
NaN ₃	10 %	90,0		
<i>Aqua bidest.</i>			684,0	26,9
S30-Extrakt	1 x			350,0
Plasmid-DNA	0,3 µg ml ⁻¹			75,0
RNAse-Inhibitor (RiboLock)	40 U µl ⁻¹			7,5
T7-RNA-Polymerase	4 mg ml ⁻¹			42,9
<i>E. coli</i> tRNA	40 mg ml ⁻¹			17,5
Pyruvatkinase	10 mg ml ⁻¹			8,0
Mastermix			8.028,5	472,3
	Gesamt:	8.500,8	17.000,5	1000,1

3.3.5 Bestimmung der Fluoreszenzintensität von GFP und GFP-Fusionsproteinen

Die Messung der Fluoreszenzintensität der GFP-enthaltenden Banden im SDS-PAGE-Gel wurde am Lumi-Imager F1™ mit Hilfe der LumiAnalyst Software bei einer Anregungswellenlänge von 475 nm und Emissionswellenlänge von 510 nm durchgeführt, wobei die Signalintensitäten über Biolumineszenzeinheiten (BLU) quantifiziert wurden.

Fluoreszenzmessungen am Fluorimeter wurden mit 200 µl 1 : 5000 verdünnter Probe in 96-Well OptiPlates™ durchgeführt, wobei die Anregung bei 475 nm (2,5 nm *slit*) und die Emission bei 509 nm (2,5 nm *slit*) erfolgte.

3.3.6 Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Proben, die eine zu niedrige Proteinkonzentration für eine Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot aufwiesen, wurden einer Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA) unterzogen, um sie zu konzentrieren. Dafür wurde die proteinhaltige Lösung mit TCA 100 % im Verhältnis 4 : 1 gemischt und 30 min bei 4 °C inkubiert, was zur Denaturierung und somit zum Ausfallen des Proteins führte. Nach 10 min Zentrifugation bei 13.000 *g* und 4 °C wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 875 µl 4 °C kaltem Aceton resuspendiert, 5 min bei 4 °C inkubiert, 5 min bei 13.000 *g* und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde dreimal ausgeführt. Das erhaltene Pellet wurde bei 70 °C für 5 min getrocknet, dann mit 20-40 µl PBS-Puffer resuspendiert und für 60 min bei 4 °C inkubiert.

3.3.7 Reinigung zellfrei hergestellter Membranproteine

Die Reinigung von zellfrei hergestellten Proteinen in Detergensemizellen erfolgte über eine Nickel-Affinitätschromatographie und eine anschließende Größenausschlusschromatographie, wobei es nötig war, bei jedem Arbeitsschritt mit einer Detergengkonzentration oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) zu arbeiten. Die Konzentrationen der während der Reinigung genutzten Detergenzien und ihre CMC in Wasser können Tabelle 3.6 entnommen werden.

Tabelle 3.6: Kritische Mizellbildungskonzentrationen der für die Proteinreinigung verwendeten Detergenzien und ihre eingesetzte Konzentration.

Detergens	CMC (%)	Eingesetzte Konzentration (%)
Brij® 78	0,005	0,05
DDM	0,0087	0,05
Fos-Cholin 12	0,047	0,1
Digitonin	0,089	0,1

3.3.7.1 Nickel-Affinitätschromatographie

Die zellfrei hergestellten Proteine wurden über ihre 10xHistidin-*tags* an Nickel-Nitrilotriessigsäure (NTA)-Agarose *beads* gebunden, gewaschen und anschließend eluiert (83, 84). Das erhaltene Volumen an zellfrei hergestelltem Protein variierte zwischen 55 µl bei analytischen und 1000 µl bei präparativen Ansätzen. Dies bedingte, dass bei ersteren nur 15 µl, bei zweiteren 300 µl NTA-*beads-slurry* (50 %) eingesetzt wurden.

Für analytische Ansätze wurden je 15 µl Nickel-NTA-*beads-slurry* dreimal mit 500 µl Reinigungspuffer gewaschen und anschließend dem Ansatz zugefügt und 3 h bei Raumtemperatur rotiert. Die *beads* mit dem anhaftenden Protein (ca. 70 µl) wurden in eine 1 ml-Spritze aufgenommen und auf eine kleine handelsübliche PCR-DNA-Reinigungssäule überführt. Anschließend wurde mit dem fünffachen Säulenvolumen 20 mM Imidazol in Reinigungspuffer gewaschen und mit dem zehnfachen Säulenvolumen 300 mM Imidazol in Reinigungspuffer nach 15 min Inkubation bei 4 °C eluiert.

Für präparative Ansätze wurden 500 µl Nickel-NTA-*beads-slurry* dreimal mit 1 ml Reinigungspuffer mit gewünschten Detergens gewaschen und dann zur Proteinlösung zugegeben. Die Bindung an die Nickel-NTA-Matrix erfolgte über Nacht unter Rotation bei 4 °C. Am nächsten Morgen wurde die Suspension in eine kleine handelsübliche PCR-DNA-Reinigungssäule überführt, gewaschen und mit zunehmenden Imidazol-Konzentrationen im detergentienhaltigen Reinigungspuffer eluiert. Dabei wurde im ersten Schritt der Puffer abgetrennt, dann mit fünf Säulenvolumina 20 mM Imidazol gewaschen und danach mit zwei Säulenvolumina stufenweise eluiert. Dabei wurden 80 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM und 500 mM Imidazol eingesetzt. Zwischen den einzelnen Waschschritten wurden die Nickel-NTA-Matrix jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die benötigten Imidazol- und detergentienhaltigen Reinigungspuffer wurden durch Mischen entsprechender Mengen 1 M Imidazol-Lösung, Reinigungspuffer 10 x und *Aqua bidest.* hergestellt. Die Elutionsfraktionen wurden durch eine SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung des Gels oder mittels Western Blot analysiert (3.2.3, 3.2.4, 3.2.5). Fraktionen präparativer Ansätze, die vorwiegend Banden des gewünschten Proteins zeigten, wurden vereinigt, um das hergestellte Protein weiter zu nutzen. Die Entfernung des Imidazols erfolgte durch Größenausschlusschromatographie (3.3.7.2).

3.3.7.2 Größenausschlusschromatographie

Nach der Nickel-Affinitätschromatographie enthielt der Puffer neben eluiertem Membranprotein in Mizellen auch viel Imidazol, was bei der Proteinkonzentrierung und weiteren Versuchen stören konnte. Daher war es nötig, im Anschluss der Nickel-Affinitätschromatographie Imidazol abzutrennen. Dafür wurde eine Größenausschlusschromatographie mit PD MidiTrap G-25 Entsalzungssäulen mit 5 kDa *cut-off* nach Herstellerangaben durchgeführt. Im Anschluss wurde das Protein konzentriert, um eine Proteoliposomenherstellung nach Protokoll (3.4.1) zu ermöglichen.

3.3.8 Proteinkonzentrierung

Um Protein im natürlichen Zustand zu konzentrieren, wurden Filter genutzt, die Proteine schonend zurückhalten. Die Proteinkonzentrierung erfolgte durch Ultrafiltration in der Zentrifuge bei 7.500 *g* für mindestens 10 min in Amicon Ultra-4 *Centrifugal Filter Devices* mit 30 kDa oder 100 kDa *cut-off* gemäß der Herstelleranleitung. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten von FNT-Proteoliposomen entstanden, wenn nicht anders vermerkt, unter Verwendung der Amicon *Filter Devices* mit 100 kDa *cut-off*.

3.3.9 Transmissionselektronenmikroskopie von Proteinen

Die Analyse von FNT-Proteinen in Mizellen erfolgte durch Transmissionselektronenmikroskopie mit Negativkontrastierung mit Hilfe der *single-droplet*-Methode nach Harris *et al.* (85–87). Sie wurde in Anlehnung an das von Arnold *et al.* beschriebene Protokoll (88) durchgeführt. Hierzu wurden die Proteinproben auf ein Kupfer-*grid*, welches mit einem durchgehenden Kohlefilm überzogen war (*continuous carbon grids, 400mesh, thin*), aufgebracht. Dieser Kohlefilm wurde zuvor mittels negativer Glimmentladung im Plasma hydrophilisiert. Nach dem Aufbringen der Proteinprobe wurde 10 s gewartet und danach das *grid* zur Kontrastierung zweimal mit einer 25,8 mM (1 % m/v) Uranyl-Acetat-Lösung gewaschen. Nach der Trocknung bei Raumtemperatur für ca. 1 min wurde das *grid* in ein JOEL 1400 Plus Elektronenmikroskop überführt, welches bei 100 kV Beschleunigungsspannung arbeitete. Die Bilder wurden mit einer TVIPS F416 Digitalkamera (TVIPS, München) bei einer Bildgröße von 2048 x 2048 Pixel und einer Vergrößerung von 50.000 x aufgenommen. So ergab sich eine Kantenlänge von 4,58 Å pro Pixel. Zur Bildanalyse wurde die EMAN2-Software (89) verwendet. Um die Auflösung zu erhöhen, wurden einzelne Proteinpartikel-Abbildungen mit dem *boxer-tool* vereinzelt und mit *e2refine2d.py* zu referenzfreien Klassensummen verrechnet. Final wurden pro Klasse 10-15 Partikel zusammengefügt. Die Anleitung der TEM-Analyse sowie die Bildanalyse erfolgte durch Dr. Philipp Arnold (Anatomisches Institut, Christian-Albrechts-Universität Kiel).

3.4 Proteoliposomen

Um die Funktionalität, Substratspezifität und Transportraten der zellfrei hergestellten FNT-Proteine zu untersuchen, wurden FNT-Proteoliposomen und als Negativkontrolle leere Liposomen (Leerliposomen) hergestellt.

3.4.1 Präparation von Proteoliposomen und Leerliposomen

Eine Lösung von 25 mg polaren *E. coli*-Lipidextrakt in 1 ml Chloroform wurde für mindestens 10 min unter Stickstoffbegasung und anschließend für 30 min im Vakuum zur Trockne gebracht. Der entstandene Lipidfilm wurde mit 500-1000 μl 2 mM β -Mercaptoethanol in Liposomen-Puffer für 2-3 h bei Raumtemperatur rehydratisiert, dann aliquotiert, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Lipidsuspension einer Gesamt-Lipidmenge von 5 mg ($5\text{ mg } 100\text{ }\mu\text{l}^{-1}$ oder $5\text{ mg } 200\text{ }\mu\text{l}^{-1}$) wurde aufgetaut, mit 10 % (V/V) Liposomen-Puffer versetzt und für 30 s mit Stickstoff begast. Die Lipidsuspension wurde für 60-90 min bei Raumtemperatur ($20\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$) mit Ultraschall behandelt, um multilamellare Liposomen zu bilden. Um Proteoliposomen herzustellen, wurden 100 μg Protein in bis zu 30 μl Reinigungspuffer mit 0,05 % Brij[®] 78 zugefügt, mit Liposomen-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt und gemischt (90). Um für die Herstellung von Leerliposomen dieselben Bedingungen wie für Proteoliposomen zu schaffen, wurde für diese detergenshaltiger Proteinreinigungspuffer ohne Proteine im Amicon *filter device* dem Proteinkonzentrierungsschritt unterzogen (3.3.8). Die dadurch erhaltene Lösung wurde an Stelle von Proteinlösung den Leerliposomen bei der Herstellung zugefügt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde der Ansatz in 25 ml detergensfreien Liposomen-Puffer verdünnt, wodurch sich ein Gemisch aus uni- und multilamellaren Liposomen bildete. Durch diesen Arbeitsschritt kam es auch zum Unterschreiten der CMC von Brij[®] 78 (0,005 %), wodurch das Protein aus Detergens- und Detergens-Lipid-Mischmizellen in die Liposomen überführt wurde. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die entstandenen Proteo- und Leerliposomen bei 140.000 *g* für 45 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert und im Pellet gesammelt, welches mit 500 μl Liposomen-Puffer resuspendiert und auf ein Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt wurde. Die Liposomengröße wurde durch 21-fache Passage einer $0,2\text{ }\mu\text{m}$ -Membran mit Hilfe des Liposomen Extruders liposoFast[®] normalisiert, wobei sich aufgrund der eingebrachten Energie aus den multilamellaren Liposomen unilamellare Liposomen bildeten. Die verschiedenen Liposomenzubereitungen einer Charge wurden durch Mischung mit Liposomen-Puffer auf die gleiche OD_{600} eingestellt. Es wurden immer aus derselben Lipid-Charge Leer- und Proteoliposomen hergestellt und vermessen, um einen Einfluss der schwankenden Chargenqualität des *E. coli*-Lipidextraktes zu vermeiden und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erhöhen.

Die Liposomenherstellung erfolgte anfänglich nach den Protokollen von Borgnia *et al.* (91) und Wang *et al.* (5) in einem 20 mM HEPES Puffer (Liposomen-Puffer I) und wurde im Laufe der Arbeit erweitert durch die Nutzung eines Saccharose-haltigen Puffers (200 mM Saccharose, 100 mM KCl, 5 mM HEPES, 5 mM MES, Liposomen-Puffer II) nach Clement *et al.* (92).

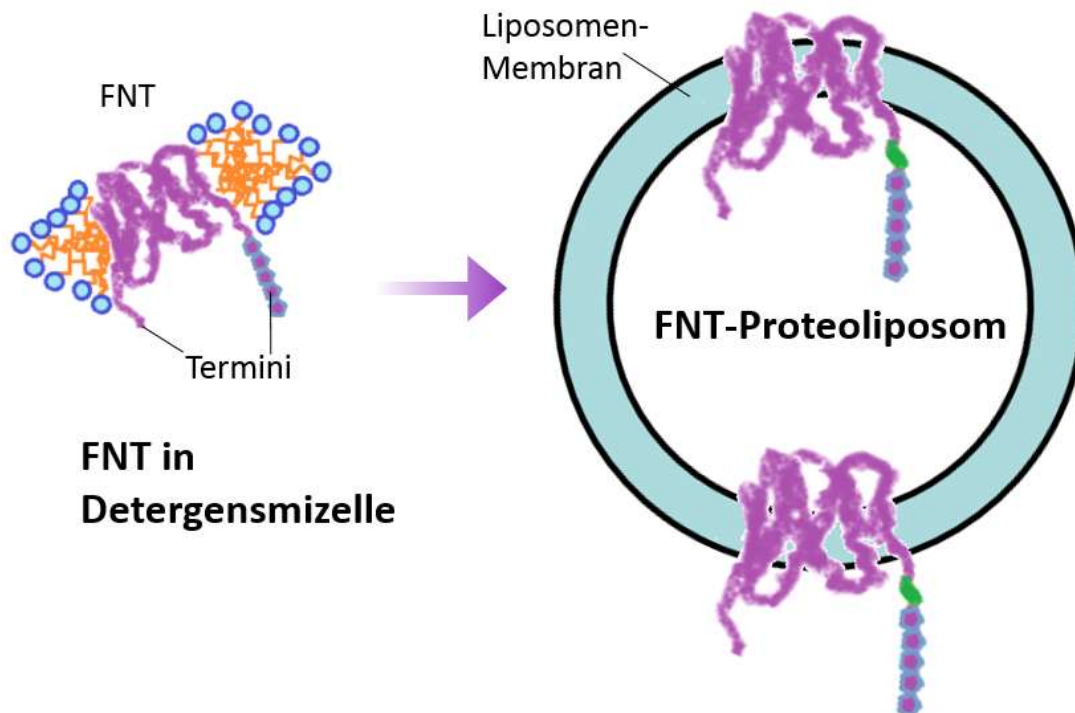


Abbildung 3.3: Schema der Proteoliposomenherstellung aus in Detergenzmizellen solubilisierten FNT. Der Einbau von FNTs kann dabei in zwei verschiedenen Orientierungen ablaufen (rechts): entweder sind die Termini nach innen oder nach außen gerichtet.

3.4.2 Beladung von Liposomen mit pH-sensitiven Fluorophoren

Um den Protonen-Co-Transportmechanismus von FNTs in Proteoliposomen möglichst direkt zu untersuchen, wurden die pH-sensitiven Fluorophore Pyranin (Trinatrium-8-Hydroxypyren-1,3,6-Trisulfonat) und ACMA (9-Amino-6-Chloro-2-Methoxyacridin) eingesetzt.

3.4.2.1 Pyranin: Eigenschaften und Einsatz in Liposomen

Pyranin (Trinatrium-8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonat, $pK_s = 7,22$, Struktur in Abbildung 3.4 A) ist ein pH-sensitives Fluorophor, was oft zur Beobachtung von pH-Änderungen im Inneren von Liposomen eingesetzt wird (93, 92, 94–98). Durch seine, bei pH 6,8 stets deprotonierten, Sulfonsäuregruppen ist jedes Molekül unter diesen Bedingungen mindestens dreifach negativ geladen. Lipid Membranen stellen eine unüberwindbare energetische Barriere für die permanent geladenen Pyraninmoleküle dar. Sie müssen bereits bei der Herstellung in Liposomen eingebaut werden. Anschließend wird das Pyranin im äußeren Medium entfernt, um eine Betrachtung der pH-Wert-Änderung im Liposomeninneren durch Fluoreszenzanalyse der eingeschlossenen Pyraninmoleküle zu ermöglichen (92, 94). Die deprotonierbare Hydroxylgruppe ($pK_s = 7,22$) liegt bei Messbedingungen (pH 6,8) hauptsächlich protoniert vor. Das Verhältnis von deprotonierten zu protonierten Molekül liegt bei 1 zu 2,6 (96).

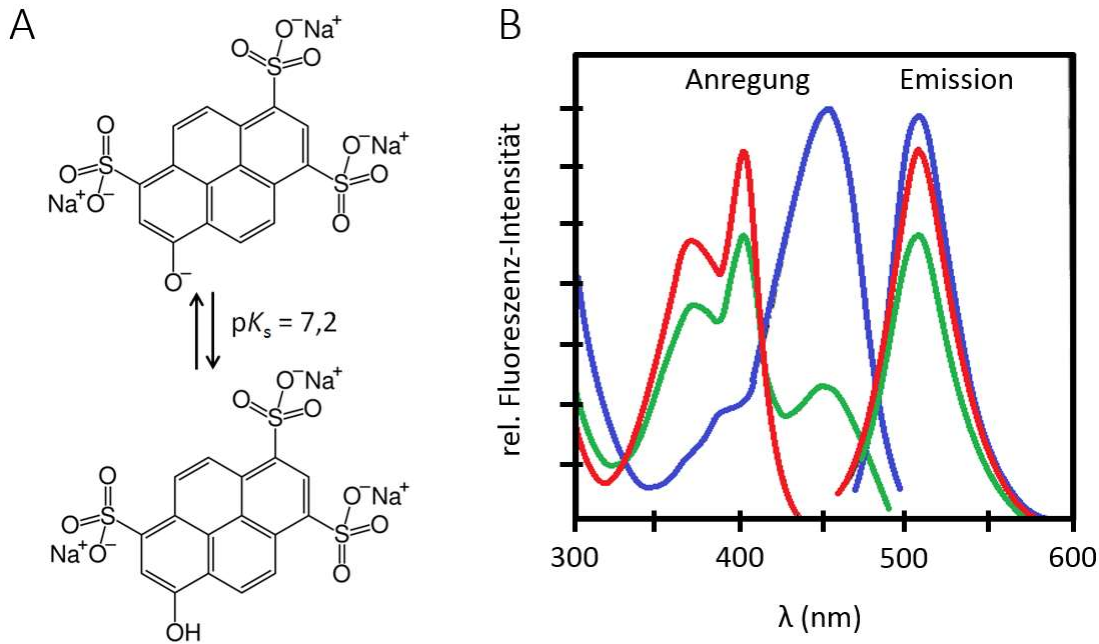


Abbildung 3.4: (A) Pyranin (Trinatrium-8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonat) Struktur der bei neutralen pH-Wert auftretenden protonierten, trianionischen und deprotonierten, tetraanionischen Form. (B) Anregungs- (links) und Emissionsspektrum (rechts) von 10^{-6} M Pyranin in wässriger Lösung bei pH 4,0 (rot), pH 7,0 (grün) und 10,0 (blau). Anregungsspektrum: Bei pH 4,0 wird die protonierte Form mit einem Absorptionsmaximum bei ca. 400 nm, bei pH 10,0 wird die deprotonierte Form mit einem Absorptionsmaximum bei ca. 450 nm erfasst. Bei pH 7,0 liegen beide Formen nebeneinander vor, weshalb beide Absorptionsmaxima erfasst werden. Emissionsspektrum: Sowohl die protonierte als auch die deprotonierte Form haben ihr Emissions-Maximum bei ca. 510 nm. Die Spektren von Pyranin in *E. coli* in Liposomen entsprechen dem von freien Pyranin bei jeweiligem pH-Wert (94, 92). Abbildung entnommen und modifiziert aus (96).

Ändert man den äußeren pH-Wert von Leerliposomen, so lassen sich Aussagen über Membrandichtigkeit gegenüber Protonen aufgrund der gemessenen Fluoreszenz-Messung des Pyranins im Liposomeninneren machen (97, 92, 99).

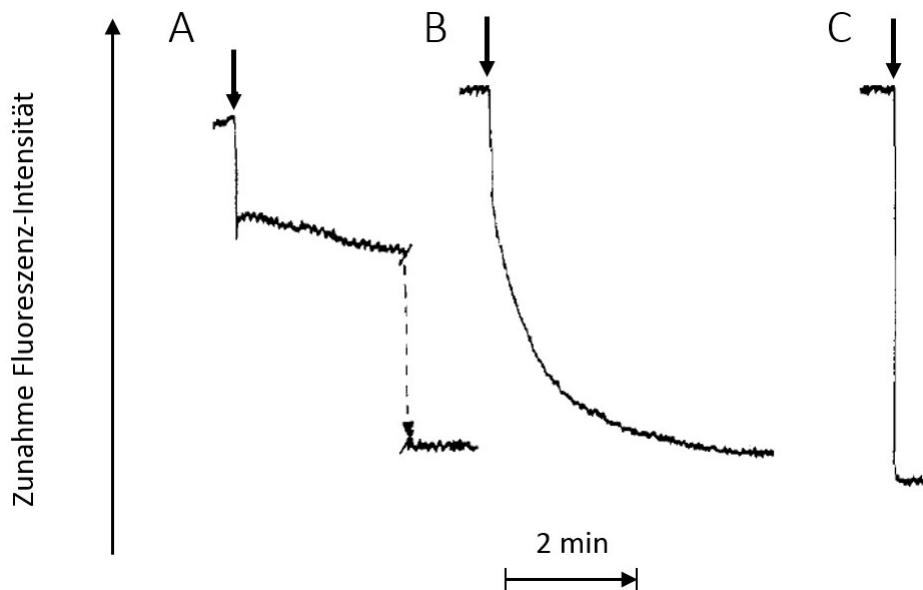


Abbildung 3.5: Pyranin-Einsatz zur Untersuchung der Protonen-Dichtigkeit von Liposomen nach Clement *et al.* Änderung der Fluoreszenz-Intensität von pyraninbeladenen Liposomen (in 200 mM Saccharose, 100 mM KCl, 5 mM MES, 5 mM Tricin pH 7,5) nach Zugabe von 12 µl 1 N HCl bei $t = 0$. Durch Anregung bei 450 nm und Messung der emittierten Lichtintensität bei 512 nm wurde die deprotonierte Form des Pyranins erfasst. (A) Nur Liposomen, (B) Liposomen mit Valinomycin- oder (C) Triton-X-100 Zusatz 2 Minuten vor HCl Zugabe. (A) Durch den Zusatz von HCl zu Leerliposomen kommt es zu einem schnellen initialen Abfall, gefolgt von einem langsameren, fast linearen. Letzterer ist bedingt durch die passive Membran-Diffusion von H^+ . (B) Durch Anwesenheit des Ionophors Valinomycin wurde die Übertragung von Gegenionen (K^+) ermöglicht, warum sich die zweite Phase des Protonen-Transports über die Membran beschleunigte. (C) Wenn die Liposomen zerstört wurden durch Triton-X-100-Zugabe, wurde die direkte Änderung des Protonierungszustand des Gesamt-Pyranins vermessen. Abbildung entnommen und modifiziert aus (92).

3.4.2.2 Pyraninbeladene Liposomen

Die Beladung der Liposomen mit Pyranin erfolgte durch die Herstellung nach Protokoll 3.4.1 mit 1 mM Pyranin in Liposomen-Puffer II in Anlehnung an das Protokoll von Clement *et al.* (92). Um nicht eingeschlossenes Pyranin von den extrudierten Liposomen zu entfernen, wurde das obige Protokoll um folgende Schritte erweitert, wobei im pyraninfreien Liposomen-Puffer II (200 mM Saccharose, 100 mM Kaliumchlorid, 5 mM HEPES, 5 mM MES) gearbeitet wurde.

Die extrudierten Liposomen wurden mit 25 ml Puffer gewaschen, vermischt und bei 140.000 g für 45 min bei 4 °C zentrifugiert, das Liposomenpellet mit 1 ml Puffer durch Vortexen resuspendiert und einer Größenausschlusschromatographie unterzogen. Dabei wurden PD-Midi Trap G-25 Säulen und ein Elutionsvolumen von über 20 ml bei 4 °C genutzt, wobei jeweils 1,0 ml Fraktionen aufgefangen wurden. Die Anwesenheit von Liposomen wurde durch Streulichtmessung bei 524 nm und die des Pyranins durch Fluoreszenzmessung bei 403 und 450 nm Anregungswellenlänge und einer Emissionswellenlänge von 512 nm detektiert. Die Fraktionen, die pyraninbeladene Liposomen enthielten, wurden vereinigt zu einem

Gesamtvolumen von 2,0 ml und zur weiteren Untersuchung bei 4 °C für maximal 2 Tage dunkel gelagert.

Zur Untersuchung des Einflusses des verwendeten Puffers und des Cholesterin-Gehaltes auf die Membrangängigkeit von Protonen wurde die Präparation unter Ersetzung des Liposomen-Puffers II (200 mM Saccharose, 100 mM KCl, 5 mM HEPES, 5 mM MES) durch Liposomen-Puffer I (20 mM HEPES) und einem Liposomen-Puffer I mit 50 mM K₂SO₄ und mit 0 %, 33 % und 50 % (m / m bezogen auf Lipidgehalt) Cholesterin durchgeführt (siehe 4.6.3).

3.4.2.3 ACMA: Eigenschaften und Einsatz in Liposomen

ACMA (9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridin) ist ein pH-sensitives Fluorophor, das eingesetzt wird, um Protonengradienten an Lipidmembranen nachzuweisen (100–108). Das Fluorophor hat abhängig vom Protonierungsgrad die verschiedenen Ladungszustände dikationisch ($pK_s = -8,6$), monokationisch ($pK_s = 8,6$), neutral ($pK_s = 18$) und anionisch (104). Für die Untersuchungen im pH-Bereich 4-9 ist allerdings nur das Gleichgewicht zwischen der einfach protonierten Monokation- und der Neutralform relevant (pK_s 8,6), was bei pH 6,8 bei 63 : 1 liegt.

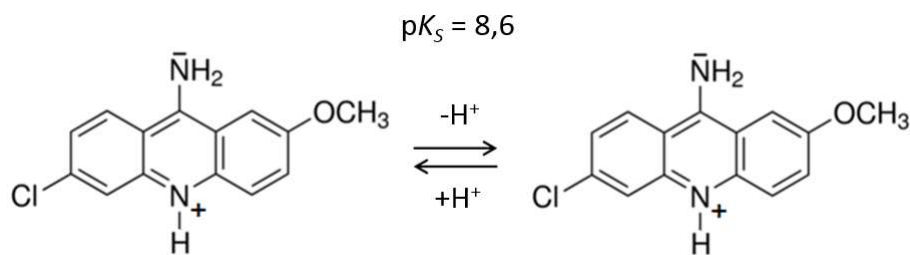


Abbildung 3.6: ACMA (9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridin) Struktur der bei pH 6,8 auftretenden neutralen und monokationischen Form, die nebeneinander in einem Gleichgewicht vorliegen. Abbildung erstellt mit Accelrys Draw 4.2.

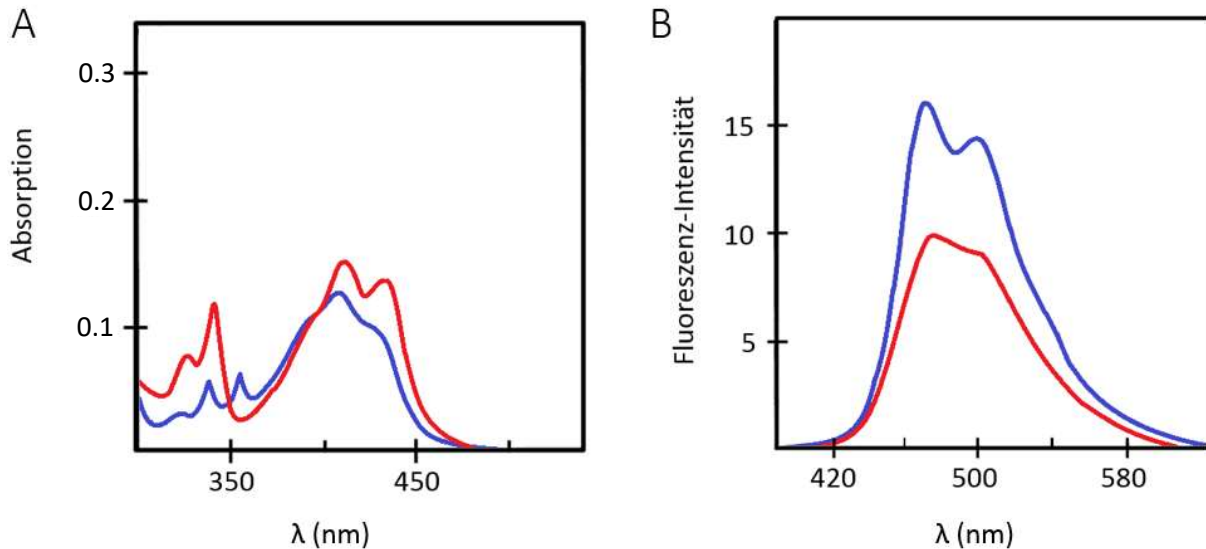


Abbildung 3.7. (A) Absorptions- und (B) Fluoreszenzspektrum von ACMA in wässriger Lösung. Absorption/Anregung des Monokations bei pH 6,5 und 4,0 (identisch) (rot, $\lambda_{\text{ex}} = 395$ nm) und der neutralen Form bei pH 11 (blau, $\lambda_{\text{ex}} = 440$ nm). Die Absorptions- und Emissionsmaxima des Moleküls liegen bei beiden Protonierungszuständen bei 410 nm und 480 nm. Entnommen und modifiziert aus (104).

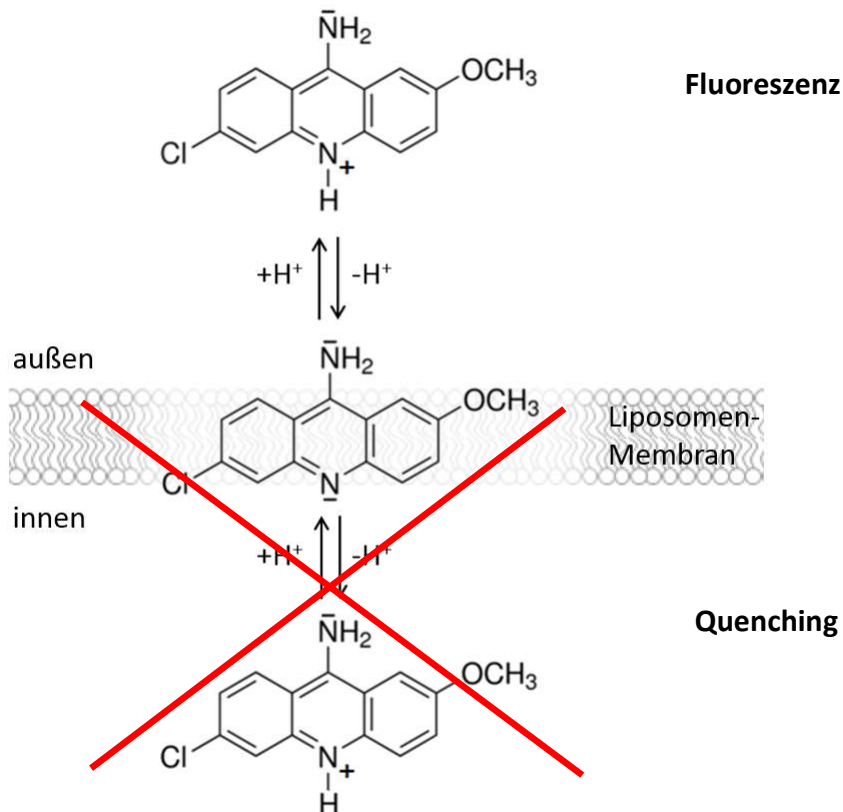


Abbildung 3.8: Verteilung von ACMA über Liposomenmembran bei pH 6,8. Die neutrale Form ermöglicht in Abhängigkeit des herrschenden Protonengradienten den Übertritt in Form eines Fließgleichgewichts. Nur in äußerem Medium vorliegendes ACMA ist der fluorimetrischen Analyse zugänglich. ACMA in Membranen und im Liposomeninneren werden gequencht. Abbildung erstellt mit Microsoft® Office PowerPoint®.

Die neutrale Form kann durch die Membran diffundieren und ermöglicht die Einstellung eines pH-Abhängigen Fließgleichgewichts zwischen der protonierten Form außerhalb und innerhalb der Liposomen (Abbildung 3.8). Kommt es durch Transport von Protonen in die Liposomen zur Azidifizierung und der damit einhergehenden ACMA-Anreicherung im Inneren, so liegen weniger Moleküle im äußeren Medium vor. Da ACMA innerhalb von Liposomen gequencht wird, sinkt bei interner Azidifizierung die gemessene Fluoreszenzintensität (100). Der beispielhafte Verlauf einer Messung, bei der sich die Änderung des Protonengradienten über die Zeit mit Hilfe von ACMA nachweisen ließ, ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Für die Untersuchung des menschlichen Protonen-Kanal Hv1 stellten Lee *et al.* (109) mit ACMA beladene Proteoliposomen mit gereinigtem Hv1-Protein her, die im Inneren eine hohe Kalium-Konzentration im Vergleich zum umgebenden Medium aufwiesen. Durch Zugabe des Kalium-selektiven Ionophors Valinomycin konnten Kalium-Ionen die Membran passieren. Um das entstehende Membranpotential auszugleichen wurden Protonen in Anwesenheit des Hv1-Kanals in die Liposomen transportiert. Die Änderung des Protonengradienten über die Zeit konnte durch das Fluoreszenz-Quenching von ACMA beobachtet werden. Durch Zugabe des Protonophors CCCP (Carbonylcyanid-*m*-chlorphenylhydrazon) wurde der Protonengradient aufgehoben und es war kein Unterschied zwischen Leerliposomen und Hv1-Proteoliposomen mehr erkennbar.

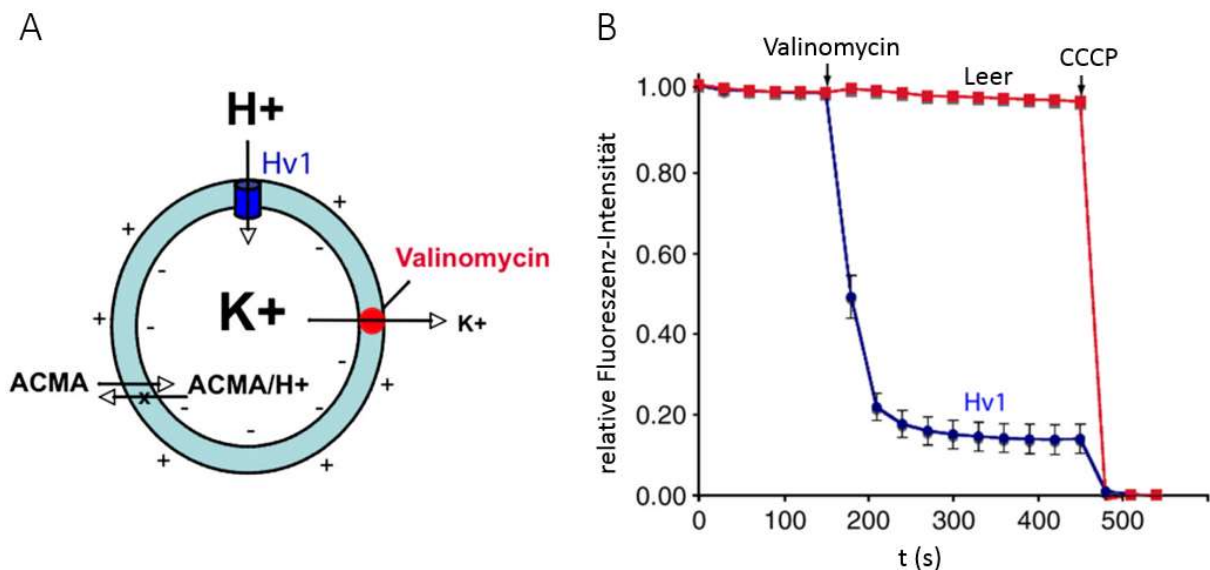


Abbildung 3.9: Beispiel eines ACMA-vermittelten Nachweises von Protonen-Transport nach Lee *et al.* (A) Modell des Versuchsaufbaus. Der Valinomycin-induzierte Kalium-Ausstrom führt zu einem Membranpotential (Liposomeninneres negativ), was wiederum den Protonen-Transport in Anwesenheit von Hv1 ermöglicht. Durch die Anreicherung der Protonen im Inneren verteilt sich ACMA vermehrt in die Liposomen und wird gequencht, was fluorimetrisch nachgewiesen wurde. (B) Fluoreszenz-Änderung über die Zeit von Leerliposomen (rot) und Hv1-Proteoliposomen. Durch Zugabe von CCCP wird der Protonengradient aufgehoben und das Experiment gestoppt. Abbildung entnommen und modifiziert aus (109).

Messung des Proton-Substrat-Symports an mit ACMA beladenen FNT-Proteoliposomen

Um den Proton-Substrat-Symport durch FNTs ohne zentrales Histidin nachzuweisen, können mit ACMA beladene FNT-Proteoliposomen genutzt werden. Gibt man den Liposomen von außen Formiat hinzu, so kann dieses in Anwesenheit von funktionellen FNTs zusammen mit Protonen in die Liposomen hineintransportiert werden (Abbildung 3.10). Der dabei entstehende Protonengradient sollte bei Betrachtung der Fluoreszenzänderung über die Zeit zu einem Abfall aufgrund von Quenching des ACMA gemäß der in Abbildung 3.9 B führen.

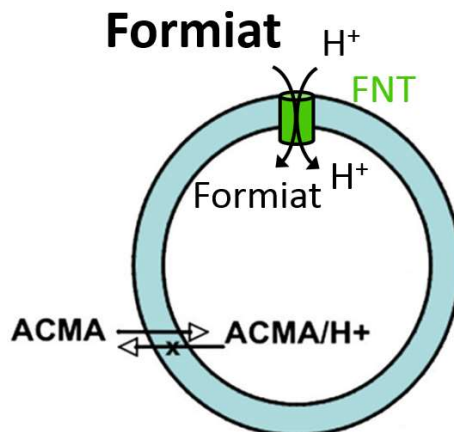


Abbildung 3.10: Schema des Proton-Substrat-Symports in mit ACMA beladenen FNT-Proteoliposomen. ACMA verteilt sich je nach Protonengradienten zwischen äußerem und innerem Kompartiment, wobei nur äußeres ACMA fluorimetrisch erfasst wird.

3.4.2.4 ACMA-beladene Liposomen

Mit ACMA versetzte Liposomen werden verwendet, um die Bildung eines pH-Gradienten in Liposomen über die Zeit zu verfolgen (102, 107, 108).

Die Beladung von Liposomen mit ACMA erfolgte durch Mischen von 475 μl Liposomen in Liposomen-Puffer I bei pH 6,8 mit 5 μl 100 μM ACMA in Ethanol 98 % in der Küvette. Es wurde für 30 min bei Raumtemperatur auf niedriger Stärke gerührt, um die Verteilung des ACMA in die Liposomen zu ermöglichen. Während der Fluoreszenz-Messungen (Zugabe von 20 μl Gradienten-Lösung zu 480 μl mit ACMA beladenen Liposomen, siehe 3.4.3.4) betrug die Konzentration von ACMA 1 μM , was sich in Abhängigkeit des pH-Gradienten zwischen Liposomeninneren und dem äußeren Kompartiment verteilte (102, 100).

3.4.3 Untersuchungen von Liposomen

3.4.3.1 Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

Um die Qualität der Proteinrekonstitution in Liposomen zu analysieren, wurde eine Zentrifugation der Proteoliposomen in einem Dichtegradienten nach Yakata *et al.* (110) durchgeführt. Dafür wurden jeweils 700 μl Saccharose-haltiger Lösungen mit abnehmender Saccharose-Konzentration von 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 5 % und 0 % übereinandergeschichtet. Die unterste Schicht mit 30 % Saccharose bestand aus 350 μl Proteoliposomen und 350 μl

Saccharose-Lösung, in den anderen Schichten waren zu Beginn keine Liposomen enthalten. Bei einem Ultrazentrifugationsschritt bei hoher Rotation (164.000 g für 6 h bei 4 °C in einem SW60 Ti-Rotor) reicherten sich die Bestandteile entsprechend ihrer Dichte an, wobei Liposomen und Proteoliposomen idealerweise in der 15 - 20 % Saccharose Schicht zu finden sind, was bei ausreichender Liposomenkonzentration optisch durch das Auftreten eines weißen Ringes in diesem Bereich erkennbar ist (Abbildung 3.11). Nach der Zentrifugation wurden die einzelnen Schichten abgenommen und einer Proteinfällung mit Trichloressigsäure unterzogen (3.3.6), um die enthaltenen Proteinmengen zu konzentrieren. Die Proben wurden anschließend mit SDS-PAGE und Western Blot (3.2.3, 3.2.5) auf ihren Proteingehalt analysiert.

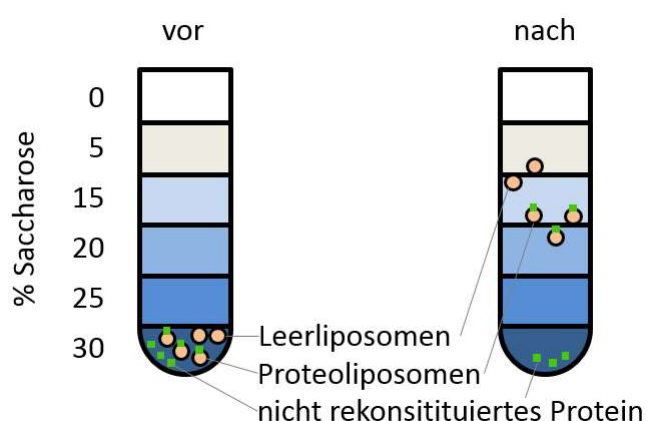


Abbildung 3.11: Schema einer Dichtegradientenzentrifugation. Links: Vor der Zentrifugation liegen Proteo- und Leerliposomen gemeinsam mit nicht rekonstituiertem Protein in der untersten Schicht mit 30 % Saccharose vor. Rechts: Während der Zentrifugation haben sich die Bestandteile gemäß ihrer Dichte in den verschiedenen Saccharose-Schichten verteilt. Die Leerliposomen sind in 5-15 %, die dichteren Proteoliposomen in 15-20 % und das nicht rekonstituierte Protein mit der höchsten Dichte bei 30 % Saccharose konzentriert.

3.4.3.2 Faktor Xa-Verdau von Membranproteinen in Mizellen und Liposomen

Der Proteaseverdau von Faktor Xa-Schnittstellen wurde in Anlehnung an das Protokoll *Faktor Xa Protease treatment of fusion proteins containing Factor Xa recognition site* (the QIAexpressionist 08/2002) durchgeführt. 49 μg solubilisiertes Membranprotein in 7 μl Reinigungspuffer mit 0,05 % Brij[®] 78 (3.3.7) wurden ergänzt mit 5 μl 100 mM Calciumchlorid-Lösung und 15 μl Faktor Xa Protease-Lösung (1 U μl^{-1}) und mit 0,05 % Brij[®] 78 enthaltenden Liposomen-Puffer II (2.9.5) auf 500 μl aufgefüllt und gemischt. Anschließend wurde 9 h bei Raumtemperatur inkubiert. Für den Faktor Xa-Verdau von Proteoliposomen wurden 480 μl Proteoliposomen mit einer Gesamtproteinmenge von 48 μg Protein mit 5 μl 100 mM Calciumchlorid-Lösung und 15 μl Faktor Xa Protease-Lösung (1 U μl^{-1}) versetzt und gemischt. Anschließend wurde 9 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kontrollen wurden unter Austausch von Faktor Xa Protease-Lösung gegen *Aqua bidest.* durchgeführt. Im Anschluss an den Proteaseverdau wurde eine TCA-Fällung durchgeführt (3.3.6), um die Detektion mittels SDS-PAGE und Western Blot zu ermöglichen (3.2.3, 3.2.5).

3.4.3.3 Streulicht-Untersuchungen an Liposomen

Dynamische Streulicht-Messung zur Größenuntersuchung

Die Liposomengröße wurde mit Hilfe einer dynamischen Streulichtmethode (DLS) bestimmt (111). Der aus der normalisierten Intensität erhaltene hydrodynamische Partikeldurchmesser wird dabei als Z-average und die Polydispersität der Probe als Polydispersitätsgrad (PDI) mit dem Nano series Zetasizer ZS bei 20 °C ermittelt (112). Dafür wurden zuvor die benötigte Dichte mit einem Densimeter DMA™ und die dynamische Viskosität mit einem Vibro Viscometer SV-10 ebenfalls bei 20 °C ermittelt. Dafür wurden 1 ml Liposomen mit 3 ml Liposomen-Puffer verdünnt und in der entsprechenden Apparatur unter Anleitung von Dr. Judith Heidland und Rüdiger Smal aus der Abteilung der pharmazeutischen Technologie vermessen. Für die dynamische Lichtstreuung wurde eine Polystyrol-Küvette mit 2 ml der verdünnten Liposomen befüllt und für 2 min im Zetasizer äquilibriert. Danach wurde Licht einer Wellenlänge von 633 nm eingestrahlt und die dynamische Lichtstreuung in einem Winkel von 173° gemessen. Jeweils 15 Einzelmessungen wurden von der Software automatisch zusammengefasst zu einer Messung.

Streulichtmessungen an der *stopped-flow*-Apparatur zur Bestimmung initialer Transportraten und Transportkapazitäten

Die Messung der 90°-Streulichtänderung von Proteoliposomen nach schnellem Mischen in einer *stopped-flow*-Apparatur ermöglichte die Untersuchung der initialen Einstromraten und der Kapazität der transportierten Substratmenge von FNTs in Liposomen. Sie wurde in Anlehnungen an die von Wang *et al.* (5) beschriebene Methode durchgeführt. Dabei wurden Proteoliposomen oder Leerliposomen bei 20 °C innerhalb von 1,6 ms mit gleichen Volumen an Gradientenlösung gemischt. Letztere enthielt zusätzlich zu den Pufferbestandteilen ein Substrat der FNT-Transporter, das unter Versuchsbedingungen nicht permeabel für Liposomenmembranen war (5). Der beim Mischen entstandene chemische Gradient zwischen Liposomenäußeren und -inneren war dabei initial 15 mM bis 200 mM an Na-Formiat, Na-Acetat oder Na-L-Laktat in Abhängigkeit der genutzten Liposomen- und Gradientenlösung. Nach dem Mischen wurde über 80 s die Änderung der Lichtstreuung des eingestrahlteten Lichtes von 524 nm Wellenlänge gemessen (weitere Einstellungen siehe

Tabelle 3.7). Pro Injektion wurden 75 µl Probe mit 75 µl Gradientenlösung in einer Durchflusszelle gemischt, so dass die Messzelle pro Messung ca. 375 µg Lipide mit 7,5 µg Protein enthielt. Um zu überprüfen, ob der Proteineinbau in Liposomen nicht zu einer erhöhten Membrandurchlässigkeit führte, wurden die Proteoliposomen mit nicht durch FNTs transportierbare Stoffe wie D-Sorbitol oder NaCl getestet. Die Streulichtintensität in Abhängigkeit von der Zeit wurde erfasst und jeweils 4-9 Einzelmessungen zu einer Kurve gemittelt, normiert und mit dem BioKine32® V4.70-Programm gefittet und ausgewertet. Die Normierung erfolgte durch Verschiebung der initialen Streulichtintensität auf null bei $t = 0$ und Multiplikation der einzelnen Punkte mit einem Faktor, so dass der Maximalwert der Kurve bei 1,0 lag.

Tabelle 3.7: Einstellungen und Eigenschaften der *stopped-flow*-Apparatur

Xe/Hg-Lampe	100,0 W
Totzeit	1,6 ms
Flussrate	14 ml/s
Photomultiplier	400 x
Output Filter	300 μ s
Temperatur	20 °C

Interpretation und Auswertung von Streulichtkurven

Die Änderung der 90°-Lichtstreuung in der *stopped-flow*-Apparatur ließ Rückschlüsse auf die Liposomengröße zu: Je kleiner das Signal zu einem bestimmten Zeitpunkt war, desto größer waren die Liposomen (113–115, 99).

Der osmotische Gradient, der sich beim schnellen Vermischen einstellte, bewirkte ein schnelles Zusammenziehen der Liposomen, da Wasser als kleines Neutralteilchen durch die Lipid-Membranen durch passive Diffusion austrat und der osmotische Gradient weitestgehend ausgeglichen wurde. Dies führte zu einer Steigerung des registrierten Streulichtes. Die erfasste zeitabhängige Streulichtkurve verlief daher zunächst einfach exponentiell und erreichte ihr Plateau in Abhängigkeit des angelegten Gradienten nach ca. 5 s. Der chemische Gradient war nach Ablauf dieser ersten Phase noch nicht ausgeglichen. Dies führte dazu, dass Substrat entlang seines Konzentrationsgefälles in die Proteoliposomen aufgenommen wurde, wenn Substrattransport möglich war. Bei Leerliposomen war dies aufgrund fehlender Membranproteine mit Transporter-Funktion nicht möglich. Durch die Aufnahme der osmotisch aktiven Substratteilchen in Proteoliposomen diffundierte Wasser passiv über die Lipidmembran zurück in das Proteoliposomeninnere und sie schwollen an. Durch diesen Effekt war im zweiten Teil der zeitabhängigen Streulichtmessung von Proteoliposomen ab ca. 5 s ein Abfallen der Kurve zu beobachten, bei Leerliposomen jedoch nicht. Das Streulichtsignal von Leerliposomen verblieb nach Erreichen des Maximums in einem Plateau. Die Maxima der Kurven von Proteo- und Leerliposomen wurden dabei auf eine Intensität von 1,0 normiert. Beispielkurven sind in Abbildung 3.12 A dargestellt.

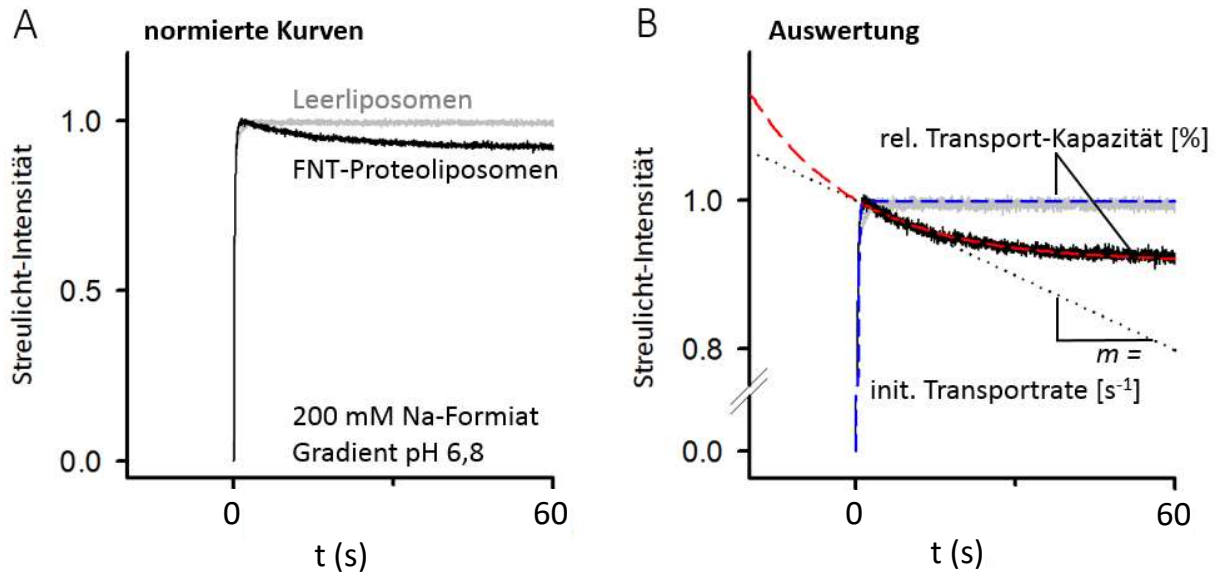


Abbildung 3.12: (A) Beispielkurven einer Streulichtmessung in der *stopped-flow*-Apparatur von FNT-Proteoliposomen bei Messung gegen 200 mM Gradient an Substrat (schwarz) und einer nicht von FNTs transportierten Verbindung (grau). **(B)** Auswertung der normierten Kurven aus (A). Die Streulichtänderung aufgrund des osmotischen Schocks mit 400 mOsmol lässt sich durch eine einfach-exponentielle Kurve beschreiben (blau gestrichelt). Bei Substrattransport ist dieser ersten Exponentialfunktionskurve eine zweite überlagert, die den Transport von Formiat und das damit verbundene Anschwellen der Proteoliposomen wiedergibt (rot gestrichelt). Die mathematische Ableitung dieser Funktion für $t = 0$ gibt die Steigung der Tangente der Kurve (schwarz gepunktet) zu Beginn der Messung, also die initiale Transportrate wieder. Der Unterschied der Intensitätswerte der gefitteten Kurven gibt die relative Transportkapazität wieder. (Genutztes Beispiel: PpfNT-Proteoliposomen, 200 mM Formiat-Gradient und Natriumchlorid bei pH 6,8 ($n \geq 3$).)

Der Verlauf der Streulichtkurven ließ sich durch Exponentialfunktionen nach der folgenden Formel beschreiben (99), das *fitting* erfolgte mit dem BioKine32® V4.70-Programm (Abbildung 3.12 B).

$$f(t) = b + \sum_{i=1}^N c_i e^{-k_i t}$$

Dabei ist b der Streulichtintensitäts-Wert der Kurve bei unendlicher Messzeit. Der Wert c_i ist die Ordinate und k_i der reziproke τ -Wert (Herleitung s.u.) eines einzelnen Exponentialfunktionsterms. Für Leerliposomen, die keinen Einstrom des Substrats zeigten, wurde ein einfach exponentielles *fitting* ($N = 1$), für Proteoliposomen ein zweifach exponentielles *fitting* ($N = 2$) genutzt. Der erste Exponentialterm gibt den Wasserausstrom aus Liposomen aufgrund des osmotischen Schocks bei $t < 5$ s an. Der zweite Exponentialterm bei $t > 5$ s gibt den Wassereinstrom in Liposomen aufgrund des Transports osmotisch aktiver Substrate in die Liposomen an, wie in der graphischen Darstellung in Abbildung 3.12 erkennbar ist.

Die Auswertung der aus dem *fitting* erhaltenen Exponentialfunktion wurde mit Microsoft® Excel durchgeführt. Die mathematische Ableitung einer Exponentialfunktion bei $t = 0$ wurde genutzt, um die Steigung der Exponentialkurve bei $t = 0$ und damit die initiale Transportrate K zu ermitteln.

$$f(t) = b + c_i e^{-k_i t}$$

$$f'(t) = -c_i k_i e^{-k_i t}$$

$$f'(t) = -c_i k_i e^{-k_i t}$$

$$f'(0) = -c_i k_i = K \text{ [s}^{-1}\text{]}$$

Die initiale Transportrate K wird demzufolge durch Multiplikation von c_i und $-k_i$ erhalten. Falls Leerliposomen auch eine leichte Durchlässigkeit für Substrat aufwiesen, wurde auch für sie eine Transportrate bestimmt und die von der der Proteoliposomen subtrahiert, um nur den Transport von eingebautem FNT-Protein zu analysieren.

Die Transportkapazität der normierten Kurven wurde wie folgt ermittelt. Kurven von Leerliposomen oder von Nicht-Substraten an FNT-Proteoliposomen hatten in der Regel keine Transportaktivität und ließen sich einfach exponentiell beschreiben. Durch die Normierung der Kurven auf eine Intensität von 1 gilt für unendliche Messdauer:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} (f(t)) = b = 1$$

Tritt unter Messbedingungen nach unendlicher Zeit unter idealen Bedingungen und bei bidirektional gleicher Transportfunktion Isoosmose ein, so schwellen Liposomen wieder auf dieselbe Größe wie zu Versuchsbeginn, die Streulichtintensität nimmt also wieder den Anfangswert ein. Da I_0 bei 0 liegt muss demzufolge nach unendlicher Messdauer die Intensität wieder auf 0 abfallen.

$$\lim_{t \rightarrow \infty} (f(t)) = b = 0$$

Eine Transportkapazität von 100 % wird also bei $b = 0$ und von 0 % bei $b = 1$ erreicht. Die relative Transportkapazität berechnet sich folglich aus:

$$C = (1 - b) 100 \text{ [%]}$$

Um ein Vergleich der Transportraten [s^{-1}] mit anderen Systemen zu ermöglichen, wurden zudem der τ -Wert [s] aus den experimentellen Daten errechnet. Der τ -Wert (Zeitkonstante) gibt an, bei welchem Zeitpunkt t der Messung das Signal auf das e^{-1} -fache (37%) des Ausgangssignals gefallen ist. Er wird oft für die Betrachtung sehr schneller Prozesse wie dem Transport von Wasser durch Aquaporine verwendet.

$$f(t) = b + ci e^{-k_i t}$$

nach $f(\tau) = b + ci e^{-1}$ gelöst:

$$-k_i \tau = -1 \Rightarrow \frac{1}{k_i} = \tau \text{ [s]}$$

Der τ -Wert ist also der reziproke Wert von k_i und unabhängig von der Normierung bzw. c_i .

Messung der Substratspektren von Proteoliposomen

Da im Zuge der Arbeit der Liposomen-Puffer geändert wurde, erfolgten die Messungen der unterschiedlichen Substrate für prokaryotische und eukaryotische FNTs in unterschiedlichen, jedoch vergleichbaren Puffer-Gradienten-Lösungen-Systemen.

Die Untersuchung prokaryotischer FNT-Proteoliposomen erfolgte mit dem zu Beginn der Arbeit genutzten System I nach Wang *et al.* (5). Die Proteoliposomen wurden mit Liposomen-Puffer I (20 mM HEPES pH 6,8) hergestellt und nach Mischung mit gleichem Volumen an Gradienten-Lösung I (40 mM Substratgradient, 20 mM HEPES pH 6,8) ein Substratgradient von 20 mM erzeugt. Im Folgenden wird diese Versuchsbedingung System I genannt.

Die eukaryotischen FNT-Proteoliposomen wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit dem System II analysiert, welches sich an der Methode von Clement *et al.* orientiert (92). Hierbei wurden Proteoliposomen in Liposomen-Puffer II (200 mM Saccharose, 100 mM KCl, 5 mM HEPES, 5 mM MES pH 6,8) hergestellt und nach Mischung mit gleichem Volumen an Gradienten-Lösung II (400 mM Substratgradient, 200 mM Saccharose, 100 mM KCl, 5 mM HEPES, 5 mM MES pH 6,8) ein 200 mM Substratgradient erzeugt. Im Folgenden wird diese Versuchsbedingung System II genannt.

In beiden Fällen dienten Leerliposomen als Negativkontrollen, die bei entsprechenden Bedingungen hergestellt und vermessen wurden. Als Substrate wurden Na-Formiat, Na-Acetat, Na-L-Laktat, als Nicht-Substrate Natriumchlorid und D-Sorbitol genutzt. Die Kombinationen der jeweiligen Liposomen-Puffer und Gradienten-Lösungen führten bei einer Mischung gleicher Volumina zu einem initialen osmotischen Verhältnis (außen zu innen) von 3 zu 1 (System I) und 2 zu 1 (System II).

Messung des pH-abhängigen Substrattransports in Proteoliposomen

Um das pH-abhängige Transportverhalten von Proteoliposomen zu untersuchen, wurden bei pH 6,8 hergestellte Liposomen mit verschiedenen Gradientenlösung (pH 4,4, pH 6,8, pH 9,2) gemischt, sodass im extraliposomalen Volumen ein initialer pH-Wert von pH 4,8, pH 6,8 oder pH 7,8 entstand. Bei pH 4,8 hergestellte Liposomen wurden mit Gradientenlösung pH 2,7 oder pH 4,8 gemischt, die initialen pH-Werte der Mischungen betragen 2,8 und 4,8. Die Liposomen wurden mit System II hergestellt und vermessen, der 200 mM Substratgradient wurde dabei durch Formiat erzeugt.

Bestimmung der Acetat-Affinität von FNTs

Um eine mögliche Sättigung von FNTs zu untersuchen, wurden Liposomen in Liposomen-Puffer I (20 mM HEPES pH 6,8) mit gleichen Volumina von Gradienten-Lösungen, die neben 20 mM HEPES auch 30 mM, 60 mM, 120 mM, 240 mM und 400 mM Na-Acetat bei pH 6,8 enthielten, gemischt und vermessen. Die erzeugten Substratgradienten waren 15 mM, 30 mM, 60 mM, 120 mM und 200 mM.

3.4.3.4 Fluoreszenzuntersuchungen von Proteoliposomen

Um den pH-Wert im Inneren von Liposomen direkt nachweisen zu können, wurden diese mit pH-sensitiven Fluorophoren versetzt und fluorimetrisch vermessen. Außerdem wurde mit fluorophorbeladenen Leerliposomen untersucht, wie sich Pufferzusammensetzung und Cholesterolgehalt auf die Membranstabilität gegenüber Protonen und deren Gegenionen auswirken. Dafür wurden zu 480-500 µl der fluorophorbeladenen Liposomen 3,85-20 µl einer Lösung gegeben und gemischt, was zur Ausbildung eines Substrat- oder Protonengradienten führte. Die Änderung der Fluoreszenzintensität über die Zeit wurde am LS 55 Fluorimeter mit einer Halb-Mikroküvette QS mit 6 mm Rührfisch gemessen und dabei auf niedriger Stufe bei 23 °C gerührt. Die *slits* waren bei allen Versuchen auf 2,5 nm und der Verstärker auf 750 V eingestellt.

Fluoreszenzmessungen an pyraninbeladenen Liposomen

Um einen durch Substrat-Proton-Symport entstehenden pH-Gradienten an Proteoliposomen nachweisen zu können, war es nötig das Liposomen-System auf seine Membrangängigkeit gegenüber Protonen und deren Gegenionen zu testen und zu optimieren. Dafür wurden 500 µl pyraninbeladene Leerliposomen (pH 6,8) nach Aufnahme von 100 s *baseline* mit 3,85 µl KOH 100 mM versetzt und dadurch ein extraliposomaler pH-Wert von 10,8 generiert. Dabei wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm die deprotonierte Form des Pyranins angeregt und die Emission bei 512 nm gemessen.

Fluoreszenzmessungen an mit ACMA beladenen Liposomen

Um das vom pH-Gradienten abhängige Verhalten von ACMA zu kontrollieren, wurden 500 µl mit ACMA beladene Leerliposomen, die in Liposomen-Puffer I hergestellt wurden, im Fluorimeter vermessen und dabei Anregungs- und Emissionswellenlänge ermittelt. Durch Zugabe von 2 µl 1 M HCl wurde der pH-Wert auf 6,0 gesenkt und erneut vermessen.

Für die zeitabhängige Untersuchung des Proton-Substrat-Symports wurden 480 µl mit ACMA versetzter Proteo- und Leerliposomen, die im Liposomen-Puffer I hergestellt wurden, in der Küvette mit Licht der Wellenlänge 410 nm angeregt und die Emission wurde bei 480 nm erfasst. Zu Versuchsbeginn wurde für mindestens 100 s eine *baseline* aufgenommen und anschließend 20 µl 4 M Gradienten-Lösung zugesetzt, um einen 160 mM Substratgradienten zu erzeugen.

3.5 Aufnahme-Assay mit ¹⁴C-markierten Substraten an *S. cerevisiae*-Zellen

Nach erfolgreicher Transformation (3.1.9) von W303-1A Δjen1 Δady2 *S. cerevisiae*-Zellen mit der Ziel-FNT-DNA wurde von einer SD-AHLW-Platte eine einzelne Kolonie in 5 ml SD-AHLW-Medium überführt. Nach Inkubation für 24 h bei 28-30 °C bei 200 rpm wurde aus dieser Vorkultur eine 200 ml Hauptkultur in SD-AHLW-Medium bei gleichen Bedingungen auf eine OD₆₀₀ von 1,0 gezüchtet. Das durch Zentrifugation der bei 2.000-4.000 g bei 4 °C für 5 min aus der Hauptkultur gewonnene Zellpellet wurde in 25 ml *Aqua bidest.* gewaschen. Durch Zugabe von Messpuffer (50 mM HEPES, 50 mM TRIS pH 6,8) wurde die Zellsuspension auf eine OD₆₀₀ von 50 (+/- 5) eingestellt und je 80 µl mit durchschnittlich 8,8 mg Hefe in 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei Raumtemperatur gelagert. Der Substratpuffer wurde mit 0,04 µCi ¹⁴C-radiomarkierten Na-Formiat versetzt. Durch Mischen von 20 µl Substratpuffer zu den 80 µl Zellsuspension wurde die Formiat-Aufnahme in die Zellen gestartet. Die Aufnahme wurde nach 20 s, 60 s oder 240 s gestoppt. Dafür wurde 1 ml eiskaltes *Aqua bidest.* mit der Zellsuspension gemischt und sofort durch einen 2,2 µm Whatman® Cellulose-Filter mit Vakuum filtriert. Die auf dem Filter verbliebenen Zellen wurden erneut mit 7 ml eiskalten *Aqua bidest.* gewaschen und anschließend der Filter mitsamt Zellen in ein Szintillationsgefäß überführt. Darin enthalten waren 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Quicksafe A), die den Filter über Nacht auflöste. Die Inhaltsstoffe der Szintillationsflüssigkeit (50-70 % p-Ethoxynonylphenol und 30-50 % Diisopropylnaphthalin) können durch den schwachen β-Strahler ¹⁴C angeregt werden, woraufhin sie Energie in Form von Licht emittieren. Bei Anwesenheit von aufgenommenem ¹⁴C-radiomarkiertem Formiat in Hefezellen wurde Licht emittiert, konnte über einen Photomultiplier verstärkt und über eine Prozessoreinheit über 2 min registriert werden. Die Anzahl von Lichtereignissen wurde anschließend als *counts per minute (cpm)* angegeben. Die minimale Aktivität wird durch Hefezellen bestimmt, die mit dem leeren Hefe-Vektor pDRTXa transformiert wurden. Die maximale Aktivität wurde durch eine Probe ermittelt, die ausschließlich 3 ml Szintillationsflüssigkeit und 20 µl ¹⁴C-radiomarkierten Substratpuffer enthält.

4 Ergebnisse

In den folgenden Kapiteln wird die Qualität der Proteinherstellung (4.1, 4.2) und der Proteoliposomen (4.3) dargestellt. Die Untersuchung der Funktionsweise und des Substratspektrums von *EhFNT* und *BtFdhC1* sind im Abschnitt 4.4 dargestellt, die während der Arbeit durchgeführten Methodenoptimierungen finden sich im Kapitel 4.6. Die in diesem Kapitel mit „Intensität“ beschrifteten Kurven bilden die gemessene Streulichtintensität ab.

Tabelle 4.1: Während dieser Arbeit in verschiedenen Expressionssystemen hergestellte Proteine und ihre aus der Aminosäuresequenz berechneten Massen eines Protomers. Berechnungen erfolgten ausgehend von den Aminosäuresequenzen mit dem ExPASy compute pI/Mw tool (116).

Protein	Masse (kDa) [rechnerisch]	in <i>S. cerevisiae</i> hergestellt	zellfrei hergestellt
<i>PfFNT</i>	35	x	x
<i>EcFocA</i>	31	x	x
<i>EhFNT</i>	40	x	x
<i>EhFNT_N283H</i>	40		x
<i>EhFNTΔ1-90</i>	29	x	x
<i>BtFdhC1</i>	28	x	x
GFP	27		x

4.1 FNT-Expression in *S. cerevisiae* und ¹⁴C-markierte Substrataufnahme

Um die beiden FNTs ohne zentrales Histidin *EhFNT* und *BtFdhC1* zu charakterisieren, wurden diese zunächst in *S. cerevisiae*-Zellen ohne endogene Monocarboxylat-Transporter (W303-1A Δ jen1 Δ ady2 Hefe-Zellen) hergestellt (3.5). Außerdem sollte mit Hilfe von aus NY17-Hefezellen isolierten sekretorischen Vesikeln die Direktionalität der FNTs untersucht werden (3.1.10). Die Expression hefeoptimierter DNA von *EhFNT*, sowie der N-terminal verkürzten Version *EhFNTΔ1-90* und der DNA von *BtFdhC1* wurde in den beiden verschiedenen *S. cerevisiae*-Mutanten nachgewiesen (Abbildung 4.1 und Abbildung 4.2). Dafür wurden die mikrosomalen Fraktionen einer SDS-PAGE und anschließender Western-Blot-Analyse unterzogen (3.2.3, 3.2.5). Es wurden viele Proteinbanden im Western Blot detektiert, die für eine Fragmentierung des Proteins sprechen (*EhFNT*, *EhFNTΔ1-90*), oder es wurde nur sehr wenig gebildetes Ziel-Protein detektiert (*BtFdhC1*, *EhFNTΔ1-90*) (Abbildung 4.1 und Abbildung 4.2). Die optimierte DNA-Sequenz von *EhFNT* ist in Abbildung 9.4 im Anhang dargestellt.

Ergebnisse

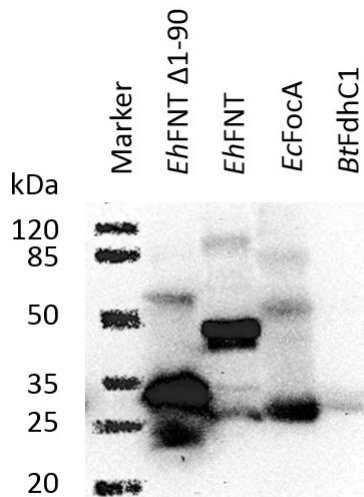


Abbildung 4.1: Mikrosomale Fraktion von FNT-exprimierenden W303-1A-*S. cerevisiae*-Zellen. Anti-Penta-His-Antikörper (1 : 5000). Größe der FNT-Protomere sind in Tabelle 4.1 angegeben. Multimere erscheinen als vielfaches der Protomere.

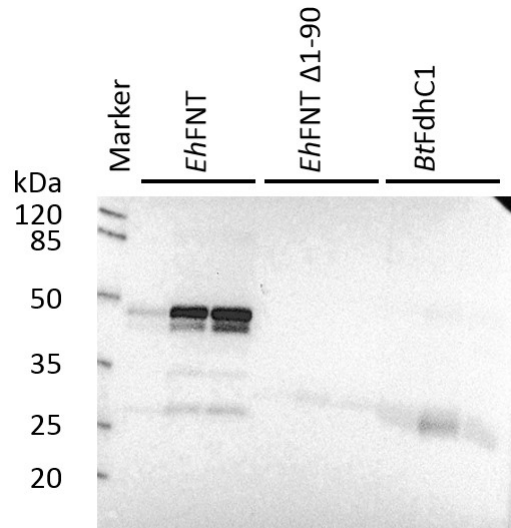


Abbildung 4.2: Zellaufschluss von *EhFNT*, *EhFNT* Δ 1-90 und *BtFdhC1* transformierten NY17 *S. cerevisiae*-Mutanten. Anti-Penta-His-Antikörper (1 : 5000). Zellsuspension, Gesamtzelllysat und mikrosomale Fraktion jeweils von links nach rechts aufgetragen.

Da bereits Versuche von Dr. André Gollmack keine Substrataufnahme durch in Hefe exprimiertes *EhFNT*, *EhFNT* Δ 1-90 oder *BtFdhC1* gezeigt hatten (Daten nicht veröffentlicht) und sich dies auch in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bestätigen ließ, wurde die Messung nur ein weiteres Mal durchgeführt (Abbildung 4.3).

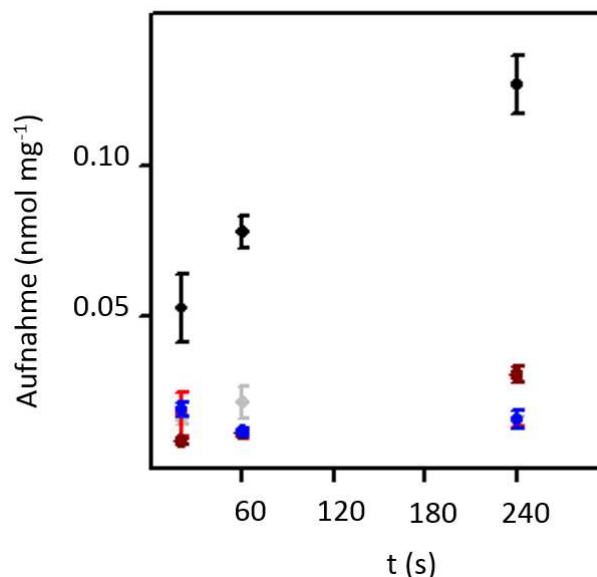


Abbildung 4.3: Aufnahme von ^{14}C -radiomarkiertem Formiat in *S. cerevisiae*-Zellen. *EhFNT* (rot), *EhFNT* Δ 1-90 (dunkelrot), *BtFdhC1* (blau) und die Negativkontrolle pDRTXa-Leervektor (grau) zeigen keine Funktion, die Positivkontrolle *PfFNT* (schwarz) zeigt Funktion durch erhöhte Substrataufnahme über die Zeit. Fehlerbalken repräsentieren S.E.M. (n = 3).

Es wurde keine Funktion für *EhFNT*, *EhFNT* Δ 1-90 oder *BtFdhC1* im ¹⁴C-Formiat-Aufnahme-Assay in Hefezellen beobachtet (Abbildung 4.3), obwohl die Proteine nach Hefe-Zellaufschluss im Western-Blot detektierbar waren (Abbildung 4.1).

4.2 Zellfreie Herstellung von *EhFNT*, *BtFdhC1* und anderer FNTs

Ziel-FNTs ohne zentrales Histidin konnten nicht in Hefezellen hergestellt und untersucht werden (4.1). Um diese dennoch einer Untersuchung zugänglich zu machen, wurde die zellfreie Proteinherstellung mit dem CECF-System nach Schwarz *et al.* angewendet (117, 80). Diese Methode war in unserem Labor bereits etabliert (81, 40) und bietet die Möglichkeit, mit wenigen Tagen Arbeitsaufwand Mengen im mg-Bereich von gereinigtem, in Detergenzmizellen solubilisiertem Membranproteinen zu gewinnen (3.3).

4.2.1 Herstellung und Qualität der S30-Extrakte

Der zur zellfreien Proteinherstellung benötigte S30-Extrakt wurde in sechs verschiedenen Chargen aus BL21(DE3) *E. coli*-Zellen nach dem Protokoll in Abschnitt 3.3.1 hergestellt. Pro Charge wurden 10-20 ml S30-Extrakt erhalten. Die im S30-Extrakt enthaltenen Proteine können ihre für die Transkription und Translation nötigen Funktionen nur bei einer bestimmten Magnesiumkonzentration effizient ausführen, wobei die Grundkonzentration an Magnesium zwischen den einzelnen Extrakt-Chargen schwankt. Für die optimale zellfreie Proteinherstellung musste daher die optimale Menge an zugesetztem Magnesium für jede S30-Extrakt-Charge ermittelt werden. Das Magnesium-*Screening* wurde durch die zellfreie Herstellung von GFP im analytischen Maßstab im Konzentrationsbereich von 8-16 mM an zugesetztem Magnesium vorgenommen (3.3.3). GFP ist ein 27 kDa schweres Protein, dessen Fluorophor bei einer autokatalytischen Reaktion von drei aufeinanderfolgenden Aminosäuren gebildet wird und das bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 395 nm oder 475 nm grün fluoresziert (118). Es wird als Indikator erfolgreicher Proteinbiosynthese und korrekter Proteinfaltung eingesetzt (81). Die Fluoreszenzintensität von GFP bzw. die Bildung von korrekt gefaltetem GFP diente zur Beurteilung der Effizienz der Proteinbiosynthese und wurde mit SDS-PAGE und In-Gel-Fluoreszenzanalyse untersucht (3.2.4, 3.2.5). Die erhaltenen GFP-Fluoreszenzintensitäten einer neuen Charge wurden mit denen einer alten verglichen, wobei jeweils die optimalen Bedingungen gewählt wurden. So war es möglich Qualitätsunterschiede zwischen einzelnen Chargen festzustellen (Abbildung 4.4).

Ergebnisse

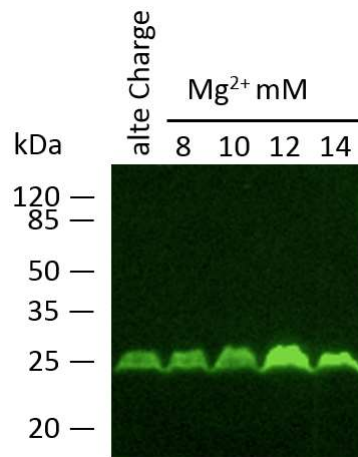


Abbildung 4.4: GFP In-Gel-Fluoreszenz beim Magnesium-Screening einer S30-Extrakt-Charge bei zunehmender Magnesiumkonzentration (8-14 mM, rechte Spuren). Die letzte Charge bei optimaler Magnesiumkonzentration dient als Qualitätsvergleich (linke Spur).

Die optimale Magnesiumkonzentration lag bei vier der sechs durchgeführten *Screenings* bei 12 mM, in den anderen Fällen bei 14 mM und 16 mM Magnesium. Die Qualität zwischen den einzelnen Chargen konnte fortwährend gehalten werden ($\pm 20\%$ bei Fluoreszenzanalyse von GFP). Die neuere Charge war stets der älteren überlegen, was sich auf die Alterung des S30-Extrakts während der Lagerung zurückführen lässt (Abbildung 4.4).

4.2.2 Herstellung und Qualität der T7-RNA-Polymerase

Die Herstellung von T7-RNA-Polymerase erfolgte unter Verwendung des Protokolls (3.3.2). Es musste für die gesamte Arbeit nur eine Charge hergestellt werden. Die erhaltene Charge wurde, ähnlich wie der S30-Extrakt, auf seine Qualität getestet (4.2.1). Dafür wurde die Fluoreszenzintensitäten von im CECF-System gebildeten GFP einer neuen Charge T7-RNA-Polymerase gegenüber den letzten beiden Vorgängerchargen (3.3.3) verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die neue Charge mindestens 20 % effizienter arbeitete als die Vorgängerchargen (Abbildung 4.5), was sich auf die Alterung der T7-RNA-Polymerase während der Lagerung zurückführen lässt.

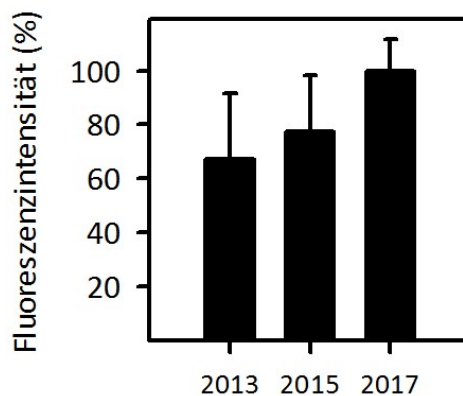


Abbildung 4.5: Vergleich der Proteinherstellungseffizienz von T7-RNA-Polymerase-Chargen 2013, 2015 und 2017 über GFP-Fluoreszenz. Fehler dargestellt als Standardabweichung (n = 3).

4.2.3 Detergenzien-Screening für die zellfreie Proteinherstellung

Zur funktionellen Analyse von *EhFNT* und *BtFdhC1* wurden je 100 µg beider Proteine in korrekter Faltung in einer Konzentration von mindestens 3,3 µg µl⁻¹ für die Herstellung von Proteoliposomen benötigt. Bei der dafür genutzten Methode der zellfreien Proteinherstellung mittels CECF-System werden die gebildeten Membranproteine in Detergenzmizellen eingebaut, welche die natürliche Umgebung der Lipidmembran nachahmen und die korrekte Proteinfaltung ermöglichen und stabilisieren. Um aus der Vielzahl von möglichen Detergenzien das für die Herstellung geeignete zu ermitteln, wurden analytische Ansätze von FNT-GFP-Fusionsproteinen in einem sogenannten Detergenzien-Screening hergestellt (3.3.3). Die für das Ziel-FNT kodierende DNA war dabei C-terminal mit einer für GFP kodierenden Sequenz verknüpft, der das Start-Methionin fehlte. Wenn es aufgrund der zellfreien Proteinsynthese zur Herstellung des fluoreszierenden GFP kam, bedeutete dies, dass die Transkription und Translation des FNT komplett abgelaufen war und mit hoher Wahrscheinlichkeit mit richtiger Proteinfaltung funktionierte (81), da sich das Fluorophor nur bei korrekter Proteinfaltung ausbildet (118). Die Fluoreszenzintensität der betreffenden Banden wurde im SDS-PAGE-Gel ermittelt (Abbildung 4.6). Durch Western Blot-Analyse (3.2.5) der Fusionsproteine konnten im Gel meistens zwei Banden beobachtet werden. Die untere Bande entsprach dabei in ihrer Größe der im Gel beobachteten, fluoreszierenden Bande des

vermutlich korrekt gefalteten, kompakten Fusionsproteins und die obere, größer laufende Bande stellte höchst wahrscheinlich inkorrekt gefaltetes, voluminöseres Fusionsprotein dar (Abbildung 4.7). Das beim Detergenzien-*Screening* ermittelte optimale Detergens sollte ein möglichst großes Verhältnis von korrekt zu inkorrekt gefaltetem Protein und eine möglichst hohe Gesamtproteinkonzentration aufweisen (81, 40).

Da *EhFNT* im *S. cerevisiae*-Expressionssystem stärkere Fragmentierung in der unverkürzten als in einer N-terminal um 90 Aminosäuren verkürzten Variante aufwies (Abbildung 4.1), wurde für das Detergenzien-*Screening* *EhFNT* Δ 1-90-GFP-Fusionsprotein genutzt. Die eingesetzten Detergenzien und ihre Konzentrationen finden sich in Tabelle 3.4 und beruhen auf den Erfahrungswerten der Vorgängerinnen Dr. Sinja Schuster (geb. Bock) und Dr. Julia Holm-Bertelsen (40). Das optimale Detergens wurde mit 1,0 % Brij® 78 (Polyoxyethylen(20)-stearylether) gefunden, da sowohl bei *BtFdhC1*-GFP als auch bei *EhFNT* Δ 1-90-GFP dort die stärkste In-Gel-Fluoreszenzbande (Abbildung 4.6) und das beste Verhältnis von richtig zu falsch gefalteten Protein beobachtet wurde (untere Bande zu oberer Bande im Western Blot in Abbildung 4.7). Die bisher in unserem Arbeitskreis zellfrei hergestellten FNTs *PfFNT* (40) und *EcFocA* ließen sich auch in Brij® 78 herstellen, dabei wurde für *PfFNT* das Konzentrationsoptimum bei 1,0 % festgestellt. Aufgrund dieses Erfahrungswertes und der vielversprechenden Ergebnisse der Detergenzien-*Screenings* bei 1,0 % Brij® 78 wurde in dieser Konzentration auch der präparative Ansatz von den zu untersuchenden Proteinen *BtFdhC1*, *EhFNT* sowie der Kontrollen *EcFocA* und *PfFNT* durchgeführt.

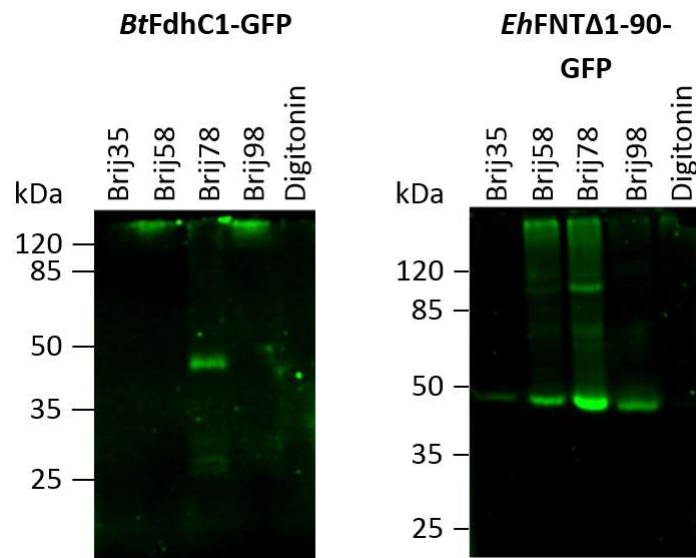


Abbildung 4.6: In-Gel-Fluoreszenz des Detergenzien-*Screenings* von *BtFdhC1*-GFP (links, 49 kDa) und *EhFNT* Δ 1-90-GFP (rechts, 48 kDa). Beide weisen im Laufverhalten im Polyacrylamidgel kleinere Massen als ihre rechnerisch ermittelten Massen aus Tabelle 4.1 auf.

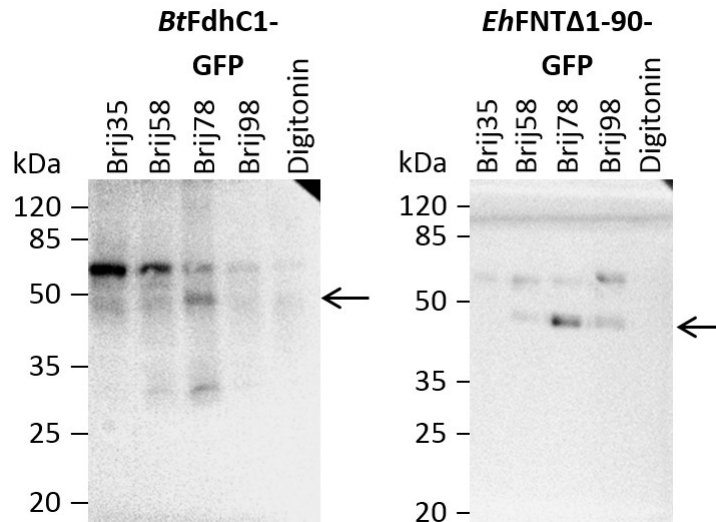


Abbildung 4.7: Western Blot des Detergenzien-Screenings von *BtFdhC1*-GFP (links, 49 kDa) und *EhFNTΔ1-90*-GFP (rechts, 48 kDa) (Anti-Penta-His-Antikörper 1 : 5000). Die Banden des vermutlich korrekt gefalteten Fusionsproteins sind mit Pfeilen markiert. Inkorrekt gefaltetes Protein läuft einige kDa darüber.

4.2.4 Reinigungsdetergenzien-Screening

Da sich das Detergens für die korrekte Herstellung im CECF-System von dem optimalen Detergens für die stabile Lagerung unterscheiden kann (119), wurde in einem weiteren *Screening* das Detergens ermittelt, welches am besten zur Proteinreinigung und Lagerung von *EhFNT* und *BtFdhC1* geeignet ist. Dafür wurde gemäß der Anleitung in Abschnitt 3.3.4 verfahren. Während der Reinigung war die eingesetzte Detergenzkonzentration im Vergleich zur zellfreien Proteinherstellung verringert in Anlehnung an das Protokoll von Newby *et al.* (119), um mögliche Interaktionen zwischen Protomeren und die Zusammenlagerung zu FNT-typischen Pentameren zu ermöglichen. Aufgrund der Erfahrungswerte der Vorgängerinnen wurde mit Digitonin 0,1 %, DDM (*n*-Dodecyl- β -D-maltosid) 0,05 %, Fos-Cholin 12 (*n*-Dodecyl-phosphocholin) 0,1 % und Brij® 78 0,05 % in Reinigungspuffer gearbeitet (Tabelle 3.6). Wie sich herausstellte, ließ sich *EhFNT* auch in unverkürzter Variante mit dem CECF-System ohne Fragmentierung herstellen (Abbildung 4.8), weshalb im Folgenden nur noch mit der unverkürzten, natürlichen Variante von *EhFNT* gearbeitet wurde.

Die Reinigung mit 0,05 % Brij® 78 erweist sich dabei sowohl bei *EhFNT* als auch bei *BtFdhC1* als überlegen, da der Großteil des Proteins erst bei hohen Imidazol-Konzentrationen über 100 mM von den *beads* eluierte und dabei kaum Protein auf ihnen zurückblieb. Das Protein zeigte dabei keinen Stabilitäts- oder Funktionsverlust über 7 Tage bei dunkler Lagerung bei 4 °C. Deshalb wurde 0,05 % Brij® 78 als Reinigungs-Detergens bei allen präparativen Ansätzen von *EhFNT* und *BtFdhC1* genutzt. Bereits zuvor konnte Julia Holm-Bertelsen in ihrer Arbeit feststellen, dass sich auch *PfFNT* mit Brij® 78 im Reinigungspuffer effizient von den Nickel-*beads* eluieren ließ (40). Diese Ergebnisse ließen sich bestätigen und auf *EcFocA* übertragen, weshalb alle in dieser Arbeit untersuchten FNTs mit 1,0 % Brij® 78 zellfrei im

Ergebnisse

präparativen Ansatz (3.3.4) hergestellt und mit 0,05 % Brij® 78 im Reinigungspuffer mittels Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt wurden (3.3.7.1). Die Coomassie-Färbungen und Western Blots erfolgreichen Brij® 78 Reinigungs-Detergenzien-Screenings von *BtFdhC1* und *EhFNT* sind in Abbildung 4.8 dargestellt, die der anderen zellfrei hergestellten FNTs *PfFNT* und *EcFocA* in Abbildung 4.9. Die Reinigungsdetergenzien-Screenings die Detergenzien als weniger geeignet identifizierten sind nicht abgebildet.

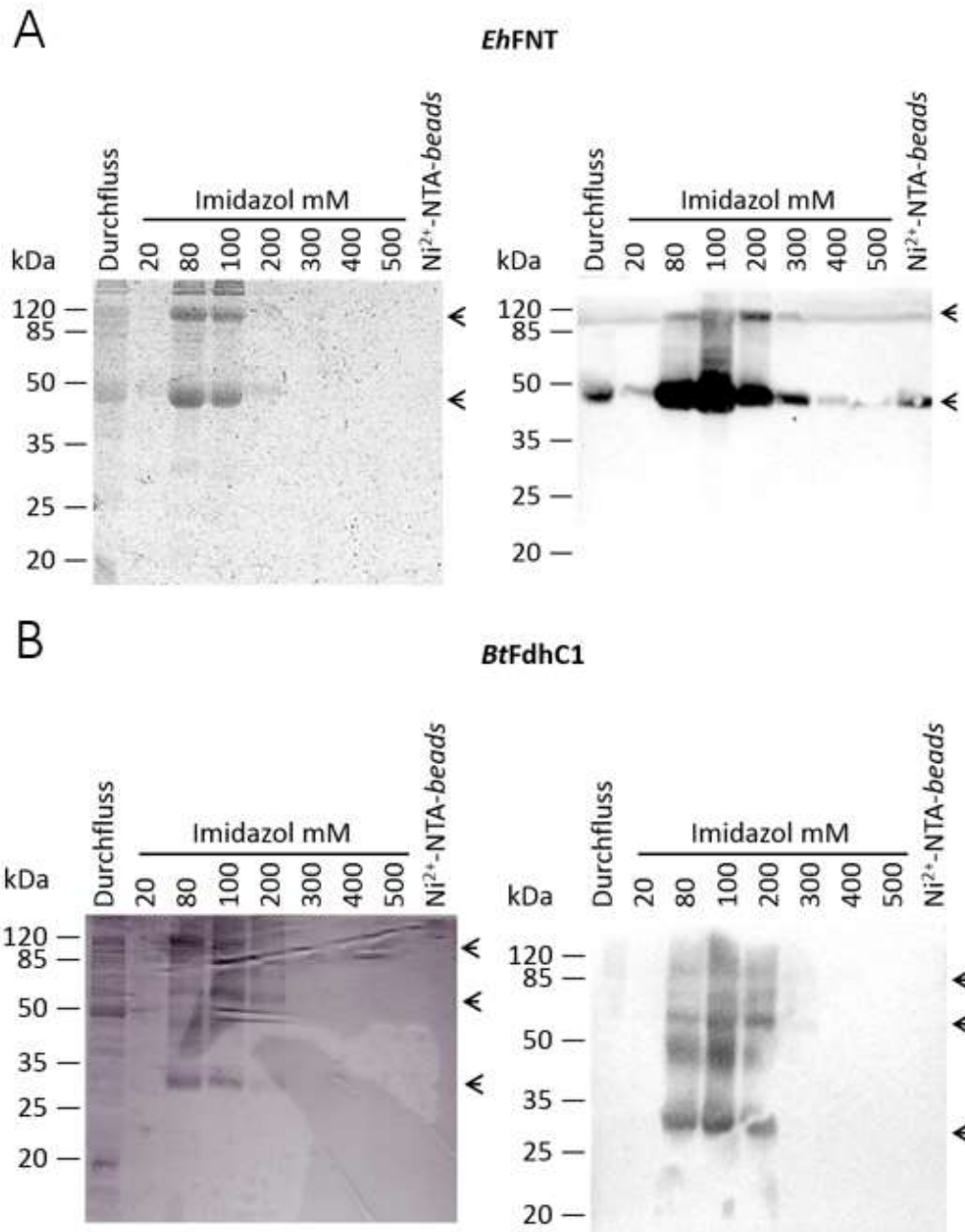


Abbildung 4.8: (A) *EhFNT* (48 kDa) und (B) *BtFdhC1* (27 kDa) mit 1,0 % Brij® 78 in präparativem Maßstab hergestellt und mit 0,05 % Brij® 78 gereinigt. Coomassie-Gel-Färbung (links) und Western Blot (Anti-Penta-His-Antikörper, 1 : 5000, rechts). Protomere und mögliche Multimere mit Pfeil gekennzeichnet.

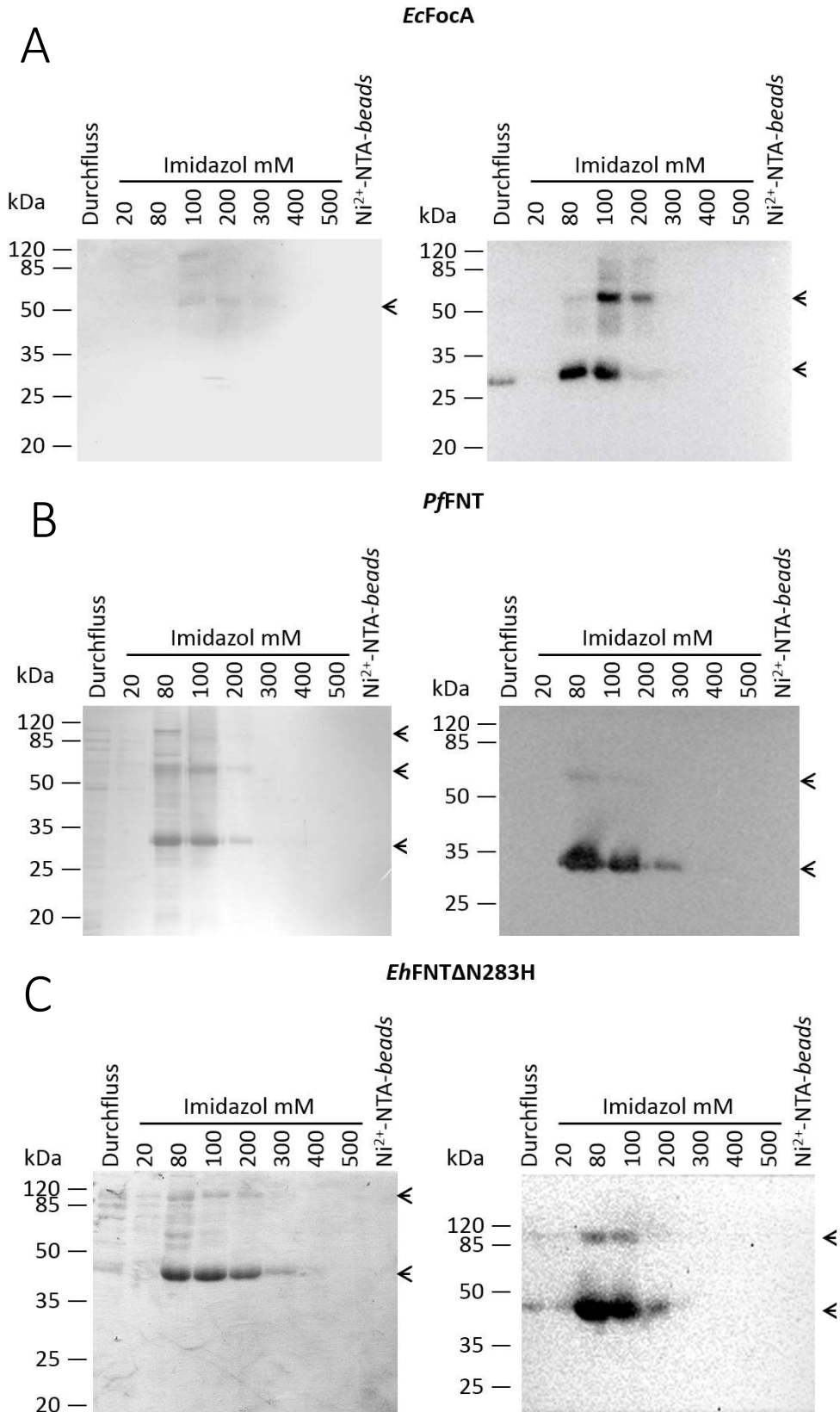


Abbildung 4.9: (A) *EcFocA* (31 kDa), (B) *PfFNT* (34 kDa) und (C) *EhFNT_N283H* (48 kDa) unter Bedingungen des präparativen Maßstabs hergestellt mit 0,05 % Brij® 78 als Reinigungs-Detergens. Coomassie-Gel-Färbung (links) und Western Blot (Anti-Penta-His-Antikörper, 1 : 5000, rechts). Protomere und mögliche Multimere mit Pfeil gekennzeichnet.

4.2.5 Zellfreie präparative Herstellung von FNTs

Die während der zellfreien Herstellung von FNTs im präparativen Maßstab durchgeführten Proteinreinigungen durch Nickel-Affinitätschromatographien (3.3.7.1) dienten gleichzeitig als Inprozesskontrollen. Die SDS-PAGE-Analysen der Elutionsfraktionen ermöglichten die Vereinigung der Fraktionen, die viel FNT im Western Blot und wenig Nicht-FNT-Protein in der Coomassie-Färbung zeigten. Dies waren zumeist die Fraktionen von 100-400 mM Imidazolkonzentration (selten: 200-500 mM), welche nach der Vereinigung vom Imidazol befreit und konzentriert wurden, bevor Proteoliposomen hergestellt wurden (Abbildung 4.8 und Abbildung 4.9). Dadurch konnten große Mengen von üblicherweise über 1000 µg pro 1 ml-CECF-Ansatz an reinem FNT-Protein gewonnen werden.

Alle zellfrei hergestellten FNTs konnten erfolgreich im Western Blot nachgewiesen werden. Bei Betrachtung der SDS-PAGE-Gele fällt auf, dass sich scheinbar gegenüber dem ionischen Detergens Sodiumdodecylsulfat (SDS) stabile Multimere gebildet haben, die sich sowohl in der Coomassie-Färbung als auch mit dem Anti-Penta-His-Antikörper nachweisen ließen (Pfeil Markierung in Abbildung 4.8 und Abbildung 4.9).

4.2.6 Transmissionselektronenmikroskopie von FNTs in Brij® 78-Mizellen

Alle bisher erhaltenen FNT-Kristallstrukturdaten zeigen Homopentamere, die sich aus einzelnen FNT-Protomeren zusammensetzen (1). Da in Brij® 78-Mizellen solubilisiertes *Eh*FNT in Western Blot-Analysen SDS-stabile Multimere aufwies (Abbildung 4.8 A), wurde untersucht, ob sich ohne SDS-Behandlung FNT-typische Pentamere nachweisen lassen. Die erwartete Pentamergröße für *Eh*FNT-Pentamere liegt nach Berechnungen von Modellen bei 8,03 nm für den Durchmesser in der Aufsicht (Abbildung 4.10).

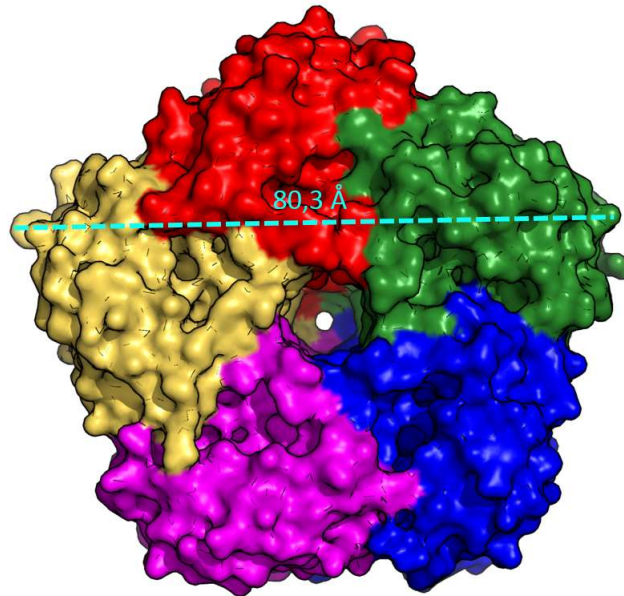


Abbildung 4.10: Modell vom *EhFNT*-Pentamer erstellt mit SWISMODEL© basierend auf dem *StFocA* Röntgenkristallographie-Daten (PDB #3Q7K). Die einzelnen Protomere sind in unterschiedlichen Farben als Aufsicht von der extrazellulären Seite dargestellt. Abbildung erstellt mit Pymol® Molecular Graphics System.

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ermöglicht die Visualisierung von FNTs in Mizellen. Brij® 78 erzeugt bei den gewählten Bedingungen kein Hintergrundrauschen. Eine Probe von *EhFNT* in 0,05 % Brij® 78-haltigen Reinigungspuffer wurde mit der in 3.3.9 beschriebenen Methode transmissionselektronenmikroskopisch vermessen (Abbildung 4.11 A). Die Klassensummenbildung erhöhte die Auflösung der einzelnen Partikel (Abbildung 4.11 B). Die als FNT-Pentamer erkennbaren Strukturen wiesen einen Durchmesser von $10,87 \text{ nm} \pm 0,06 \text{ nm}$ auf. Außerdem ließ sich die für die FNT-Pentamere typische Pore in der Mitte der Pentamere erkennen, die in der natürlichen Umgebung der Lipidmembran mit Lipiden gefüllt ist. Die FNT-typische Pentamerstruktur ließ sich auch in der Positivprobe *PfFNT* in Brij® 78-Mizellen nachweisen (Abbildung 9.5 im Anhang).

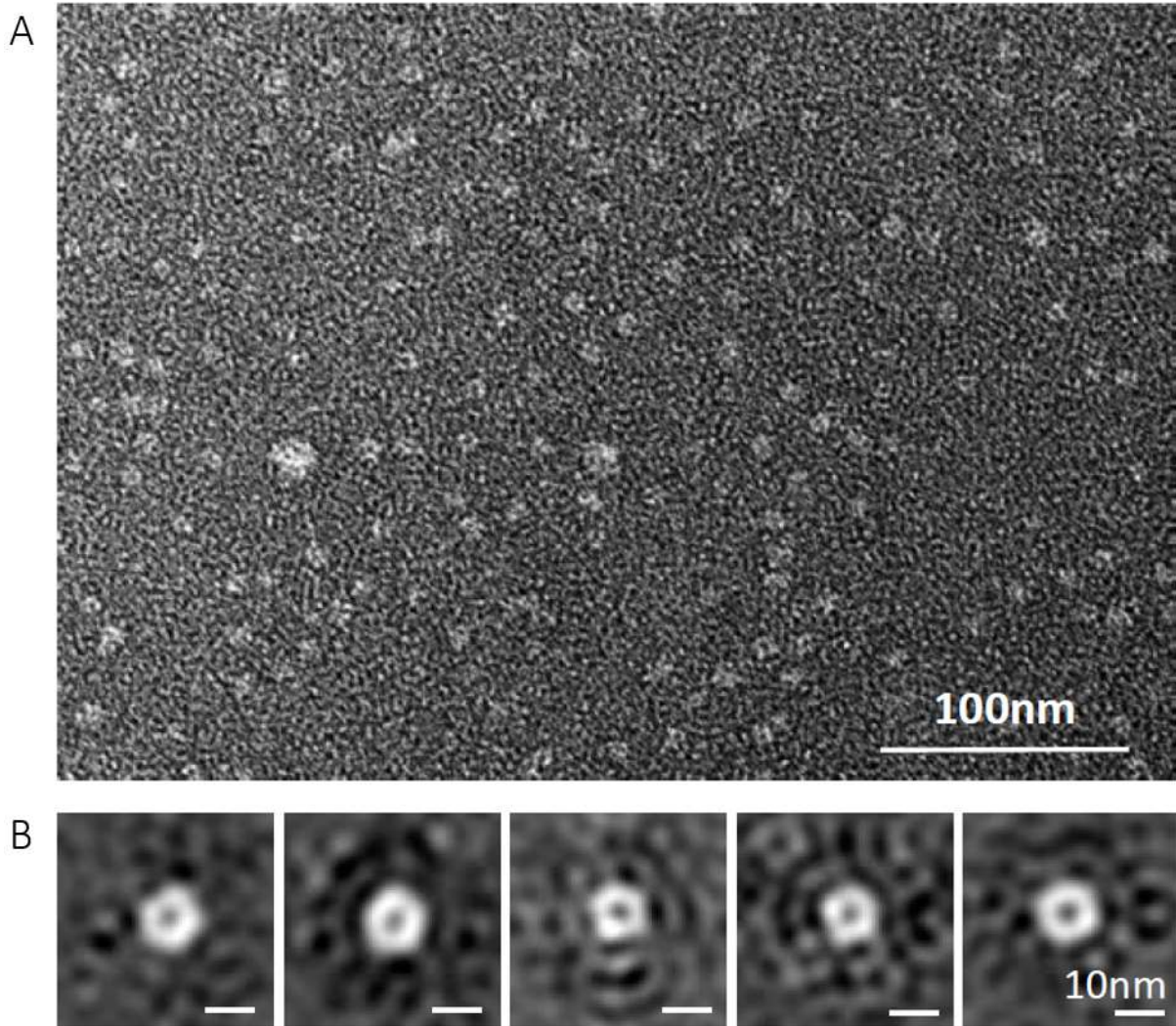


Abbildung 4.11: Transmissionselektronenmikroskopie von *EhFNT*-Protein in 0,05 % Brij® 78-Detergenzmizellen. (A) Rohdaten und (B) nach Klassensummenbildung erkennbare Pentamere.

4.3 Qualitätskontrolle von Proteoliposomen

4.3.1 Kontrolle der Liposomengröße

Der hydrodynamische Durchmesser von in Liposomen-Puffer I (20 mM HEPES pH 6,8) hergestellten Leerliposomen wurde mit dem Nano series Zetasizer ZS nach der in 3.4.3.3 beschriebenen Methode ermittelt. Der *Z-average*-Wert lag bei $(149,3 \pm 7,3)$ nm und der Polydispersitätsindex bei 0,149 (Abbildung 4.12), was bedeutet, dass es sich um eine enge Größenverteilung handelt (120). Die für die Berechnungen benötigte Dichte und die dynamische Viskosität der Liposomensuspension wurden zuvor bei 20 °C bestimmt. Die Dichte wurde mit einem Densitymeter DMA™ 48 erfasst und betrug für die Liposomensuspension (in Liposomen-Puffer I, 20 mM HEPES Puffer pH 6,8) 0,9992 g/ml. Die dynamische Viskosität der Liposomen wurde mit einem Vibro Viscometer SV-10 bestimmt und betrug 1,06 mPa s. Die ermittelte Liposomengröße von durchschnittlich 150 nm entspricht der Annahme, dass bei der

Ergebnisse

Extrusion von Liposomen durch eine $0,2\ \mu\text{m}$ Membran Teilchen, die größer als diese Porenweite sind, durch Scherung zerreißen und sich daraus neue, kleinere Liposomen bilden (121).

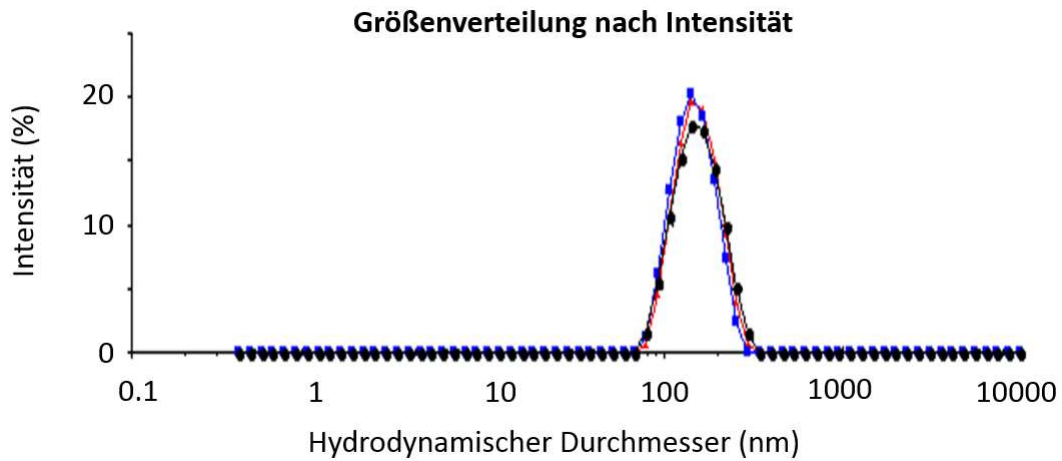


Abbildung 4.12: Im Zetasizer ermittelte Größenverteilung drei verschiedener Leerliposomenzubereitungen nach dem Extrudieren.

4.3.2 Kontrolle der FNT-Rekonstitution Liposomen

Die Rekonstitution von Protein in Liposomen wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation nach Protokoll 3.4.3.1 analysiert. Dabei wurde bereits visuell eine Anreicherung der Liposomen in den Schichten mit 15-20 % Saccharose festgestellt, was den Angaben in der Literatur entspricht (110) (Abbildung 4.13 A).

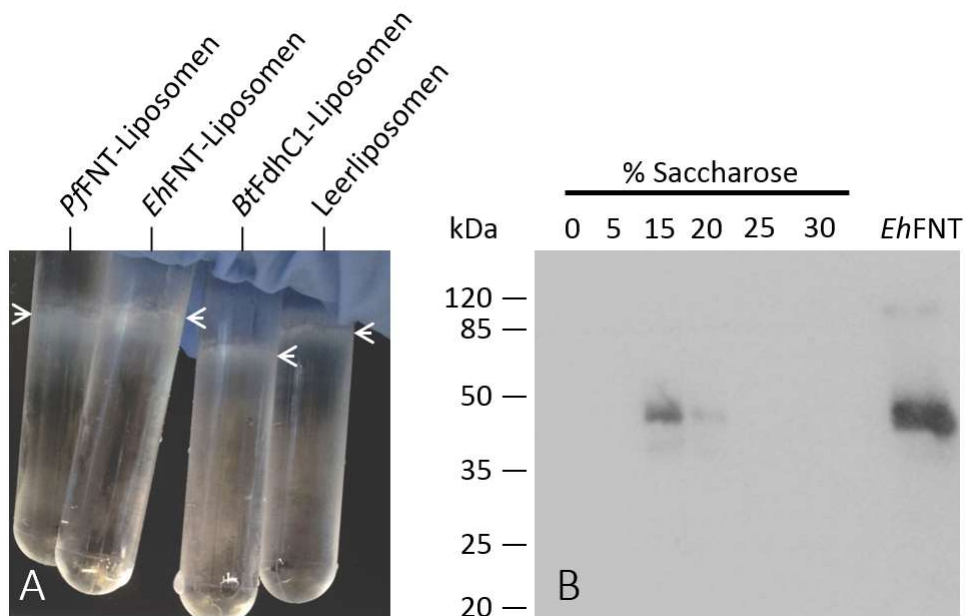


Abbildung 4.13: Dichtegradientenzentrifugation von Liposomen. (A) Die Anreicherung von Liposomen ist als weißer Ring bei 15-20 % Saccharose zu beobachten. (B) Die Western Blot-Analyse der Saccharosedichtegradientenfraktionen von *EhFNT*-Proteoliposomen. Auf der rechten Spur ist *EhFNT* in Brij® 78-Mizellen als Positivkontrolle aufgetragen (MW = 40 kDa). Detektion mit Anti-Penta-His-Antikörper 1 : 5000.

Die einzelnen Gradientenfraktionen wurden nach TCA-Fällung der Proteine gemäß der Vorschrift in Abschnitt 3.3.6 mittels SDS-PAGE-Analyse und Western Blot untersucht (Abbildung 4.13 B). Dabei wurden für FNT-Proteoliposomen bei erfolgreicher Proteinrekonstitution in den 15-20 % Saccharose-Fractionen FNT-Proteinbanden beobachtet.

Es wurde gezeigt, dass ca. 150 nm große Liposomen mit enger Größenverteilung durch das gewählte Verfahren erzeugt werden (4.3.1). Des Weiteren ließ sich die erfolgreiche Rekonstitution von *EhFNT* in Liposomen belegen (4.3.2).

4.3.3 Orientierung von *EhFNT* in Proteoliposomen

Um die Orientierung von *EhFNT*-Membranproteinen in Proteoliposomen zu untersuchen, wurde der Faktor Xa-Verdau genutzt (3.4.3.2). Ist *EhFNT* in die Proteoliposomenmembran eingebaut, so weisen dessen Termini entweder ins Liposomeninnere oder zum umgebenden Medium (Abbildung 4.14). Um seine Orientierung zu überprüfen, kann man eine zwischen Membran-Protein und einem terminalen 10xHis-tag befindliche Faktor Xa-Schnittstelle

nutzen. Gibt man von außen Faktor Xa zu *EhFNT*-Proteoliposomen mit zugänglicher Faktor Xa-Schnittstelle, so kann dieser unter geeigneten Bedingungen an dieser Stelle den *tag* abspalten, was wiederum durch SDS-PAGE und Western Blot-Analyse mit einem Anti-His-Antikörper nachgewiesen werden kann (3.2.5). Dabei sind Termini, die ins Liposomeninnere ragen, nicht für den Faktor Xa zugänglich, solche die nach außen ragen hingegen schon (40). Das Verhältnis zwischen den Bandenintensitäten der Faktor-Xa-Protease-haltigen Ansätze (+) und der unbehandelten Negativkontrolle (-) entspricht dem Verhältnis von unzugänglichen C-Termini zur Gesamtmenge der C-Termini.

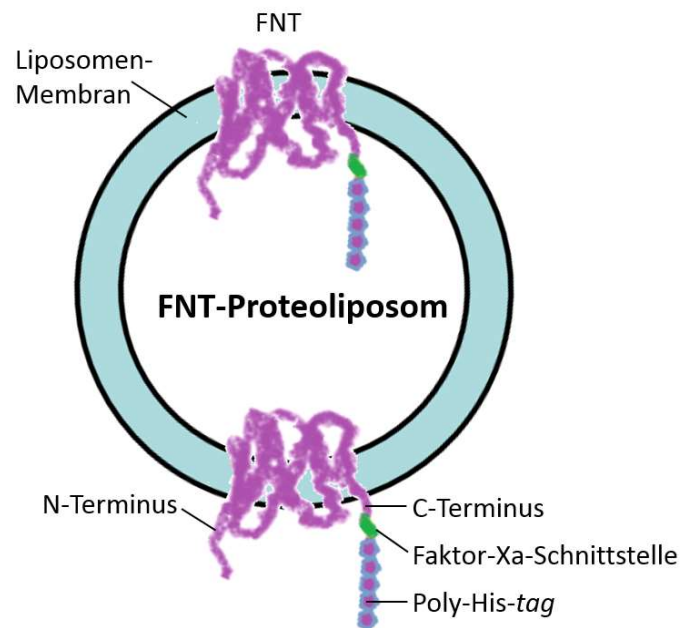


Abbildung 4.14: Die beiden möglichen Orientierungen von FNTs in Proteoliposomen. Oben entspricht sie der physiologischen Orientierung in der Plasmamembran mit den Termini innerhalb der Zelle. Unten ist sie umgekehrt mit den Termini nach außen gerichtet. Ragt die C-terminale Faktor Xa-Schnittstelle aus den Liposomen, ist sie für Faktor Xa-Protease zugänglich und wird von ihr gespalten, was zum Verlust des C-terminal endständigen His-tag führt.

Die Bedingungen für eine optimale Faktor Xa-Aktivität an Proteoliposomen wurde zuvor an Protein in Brij® 78-Mizellen bestimmt. Dafür wurden je 49 µg Protein in 7 µl Reinigungspuffer (3.3.7) mit 5 µl 100 mM Calciumchlorid-Lösung und 1,5 µl, 6 µl oder 15 µl Faktor Xa-Protease-Lösung (1 U µl⁻¹) und mit 0,05 % Brij® 78 enthaltenden Liposomen-Puffer II (2.9.5) auf 500 µl aufgefüllt und gemischt. Anschließend wurde 9 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei erwies sich die Zugabe von 15 µl als optimal, da das zu untersuchende Protein bei den gewählten Bedingungen komplett verdaut wurde. In Abbildung 4.15 ist der zugehörige Western Blot der Idealbedingung abgebildet. Bei selben Bedingungen wurde die Zugänglichkeit der *EhFNT*-Termini in Proteoliposomen für Faktor Xa untersucht. Die Ergebnisse sind im rechten Teil der Abbildung 4.15 dargestellt. Es war erkennbar, dass nur ein Teil der *EhFNT*-Proteinmenge in

Ergebnisse

Proteoliposomen verdaut werden konnte, da hier die zugehörige Bande im Western Blot nicht vollständig verschwand, wie es zuvor bei *EhFNT* in Mizellen der Fall war.

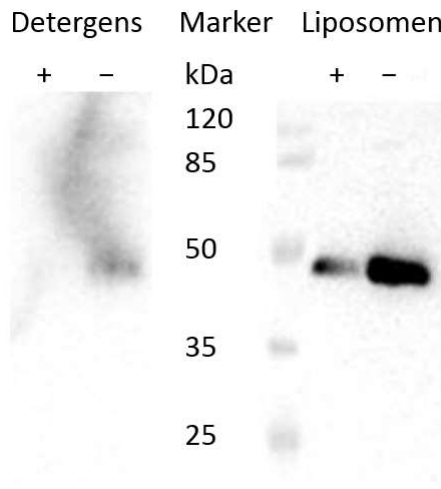


Abbildung 4.15: Western Blot vom Faktor Xa-Protease-Verdau von *EhFNT* in Brij® 78-Mizellen (links) und in Proteoliposomen (rechts) unter Zugabe von Faktor Xa (+) oder Wasser als Negativkontrolle (-) (Anti-Penta-His-Antikörper 1 : 5000).

EhFNT-Proteine integrierten sich bei der gewählten Herstellungsmethode (3.4.1) bevorzugt mit den Termini nach außen gerichtet in die Liposomenmembran (ca. 80 %), wie aus dem Verhältnis der Bandenintensitäten von Negativkontrolle und Analyse hervorgeht (Abbildung 4.15). Eine solche bevorzugte Orientierung wurde bereits zuvor bei *PfFNT* in Liposomen beobachtet (40), wo alle FNT-Proteine mit den Termini nach außen orientiert in der Liposomenmembran vorlagen. Die Orientierung der *EhFNT*-Proteine ist in Proteoliposomen umgekehrt zu der in äußeren Zellmembranen von *E. histolytica*, weshalb Substratimport in Proteoliposomen vorwiegend dem Substratexport aus den Zellen entspricht.

4.4 Untersuchung der Funktion von FNTs ohne zentrales Histidin

Um die Plausibilität der postulierten FNT-Mechanismen zu überprüfen, wurde untersucht, ob FNTs ohne zentrales Histidin, wie *Ehfnt* und *BtFdhC1*, in ähnlicher Weise wie FNTs mit zentralem Histidin, wie *Pffnt* und *EcFocA*, funktionieren.

4.4.1 Funktionsnachweis von *Ehfnt* und *BtFdhC1* mit Formiat-Gradienten

Die grundlegende Fragestellung dieser Arbeit war, ob FNTs ohne zentrales Histidin überhaupt zum Transport klassischer FNT-Substrate in der Lage sind. Das kleine Molekül Formiat diente als Modell-Substrat.

Die Daten zur Funktionalitätsanalyse der beiden Ziel-FNTs wurden mittels Streulichtmessung an der *stopped-flow*-Apparatur, wie in 3.4.3.3 beschrieben, generiert. Die prokaryotischen FNTs *BtFdhC1* und *EcFocA* wurden zu Beginn der Arbeit mit dem Liposomen-System I untersucht. Die Liposomen wurden in Liposomen-Puffer I (20 mM HEPES) bei pH 6,8 hergestellt und mit einem 20 mM Substratgradienten vermessen (Abbildung 4.16 A). Die Proteoliposomen eukaryotischer FNTs *Ehfnt* und *Pffnt* wurden zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit mit dem System II analysiert. Die Liposomen wurden in Liposomen-Puffer II (200 mM Saccharose, 100 mM KCl, 5 mM HEPES, 5 mM MES) bei pH 6,8 hergestellt und mit einem 200 mM Substratgradienten vermessen (Abbildung 4.16 B). *Pffnt*- und *EcFocA*-Proteoliposomen dienten dabei als Positivkontrollen, deren Substratprofile bereits bekannt waren (40, 15, 16, 3, 5). Sowohl *Ehfnt* und *BtFdhC1*, als auch die Positivkontrollen zeigten Transportfunktion für Formiat. Die Nicht-FNT-Substrate Natriumchlorid und D-Sorbitol wurden nicht transportiert (Negativkontrollen Abbildung 4.17). Als weitere Negativkontrolle wurden Leerliposomen ohne FNT eingesetzt.

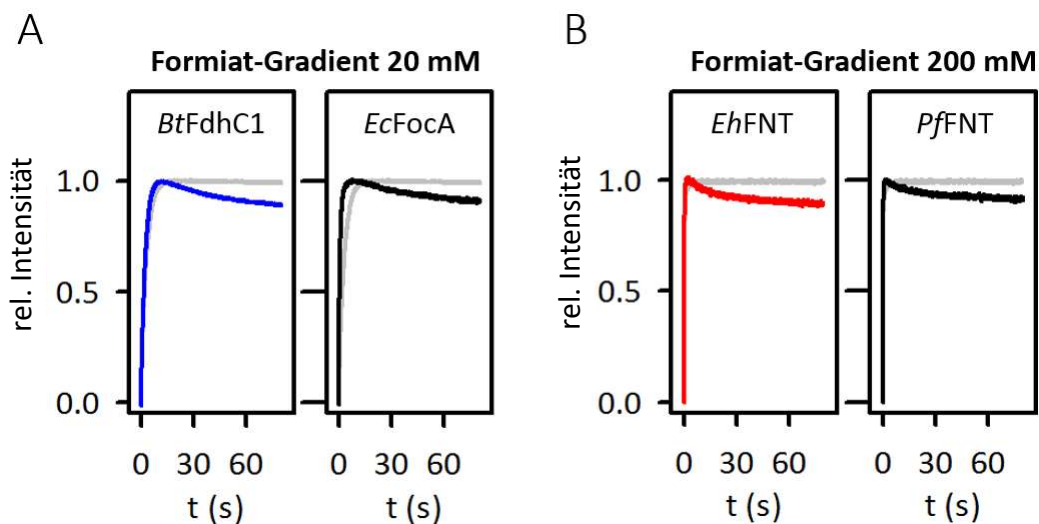


Abbildung 4.16: Streulichtmessung von FNT-Proteoliposomen mit Formiat-Gradienten bei pH 6,8 in *stopped-flow*-Apparatur (A) Prokaryoten FNTs: *BtFdhC1*- (blau), *EcFocA*- (schwarz) und Leerliposomen (grau). (B) Eukaryoten FNTs: *Ehfnt*- (rot), *Pffnt*- (schwarz) und Leerliposomen (grau). Gezeigt sind Mittelwertkurven von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Ausnahme von *EcFocA*, wo nur ein Experiment durchgeführt wurde.

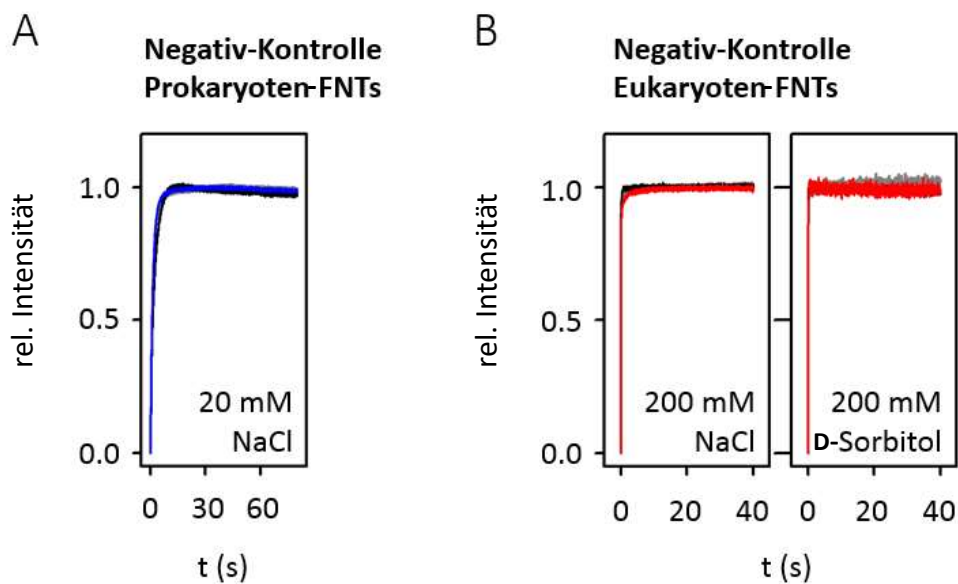


Abbildung 4.17: Stopped-flow-Streulichtmessung von FNT-Proteoliposomen Negativkontrollen: (A) 20 mM NaCl-Gradient an Prokaryoten-FNTs *BtFdhC1*- (blau), *EcFocA*- (schwarz) und Leerliposomen (grau), die in Liposomen-Puffer I hergestellt wurden. (B) 200 mM NaCl- und D-Sorbitol-Gradienten an Eukaryoten-FNTs *EhfFNT*- (rot), *PfFNT*-Liposomen (schwarz) und Leerliposomen (grau). Gezeigt sind Mittelwertkurven von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Ausnahme der D-Sorbitol-Messung, die nur einmal durchgeführt wurde.

4.4.2 Untersuchung der Substratselektivität von *EhfFNT* und *BtFdhC1*

Um das Substratspektrum von *EhfFNT* und *BtFdhC1* zu charakterisieren und um zu analysieren, ob sich die beiden FNTs gemäß den vorangegangenen Beobachtungen von Wiechert *et al.* zur Substratselektivität von eukaryotischen und prokaryotischen FNTs verhalten (16), wurden Proteoliposomen hergestellt und mit zwei weiteren bekannten, voluminöseren FNT-Substraten, Acetat und L-Laktat, in der *stopped-flow*-Apparatur nach der in 3.4.3.3 beschriebenen Methode vermessen. In einem Einzelversuch wurde außerdem erstmalig die Transportfähigkeit von FNTs gegenüber den potentiellen FNT-Substraten Propionat und Malonat im Proteoliposomen-System getestet.

Alle getesteten FNTs zeigten einen Einstrom für die klassischen FNT-Substrate Formiat und Acetat, eukaryotische FNTs auch für L-Laktat (Abbildung 4.17 und Abbildung 4.18). Aus den Kurven von mindestens drei Einzelexperimenten (jedes Experiment enthielt 3-9 technische Replikate) wurden die initialen Transportraten ermittelt, welche in Abbildung 4.19 dargestellt sind. Eine Ausnahme bildet die Rate des *EcFocA*, die nur in einem Einzelexperiment bestimmt wurde.

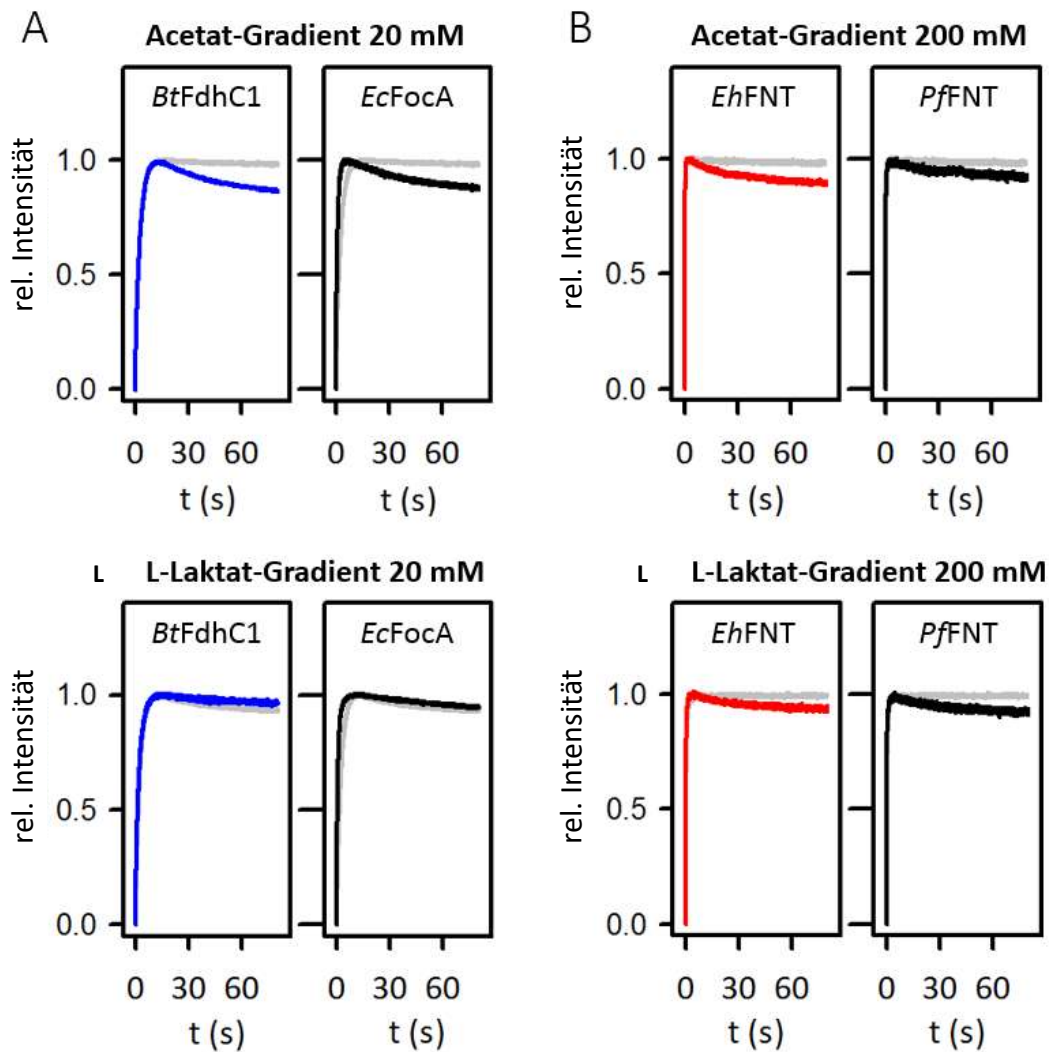


Abbildung 4.18: Streulichtmessung von FNT-Proteoliposomen mit Acetat- und L-Laktat-Gradienten bei pH 6,8 in *stopped-flow*-Apparatur. (A) Prokaryoten-FNTs: *BtFdhC1*- (blau), *EcFocA*- (schwarz) und Leerliposomen (grau) in Liposomen-Puffer I hergestellt. (B) Eukaryoten-FNTs: *EhFNT*- (rot), *PfFNT*- (schwarz) und Leerliposomen (grau) in Liposomen-Puffer II hergestellt. Gezeigt sind Mittelwertkurven von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Ausnahme von *EcFocA* (nur ein Experiment).

Ergebnisse

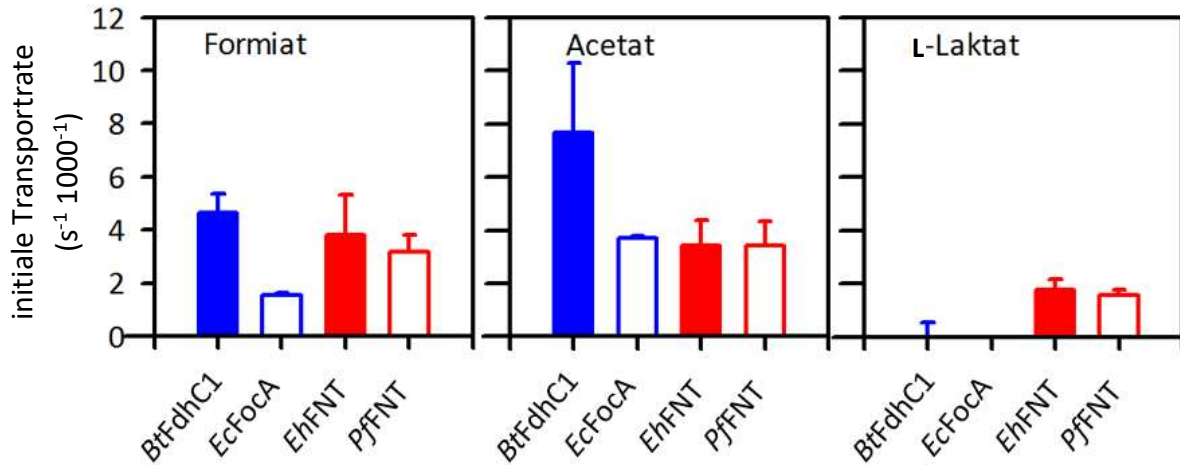


Abbildung 4.19: Initiale Transportraten von *BtFdhC1* (blau, geschlossene Balken), *EcFocA* (blau, offene Balken), *EhFNT* (rot, geschlossene Balken) und *PffFNT* (rot, offene Balken). Die Raten wurden aus den Kurven der zu Abbildung 4.17 und Abbildung 4.18 gehörenden Einzelexperimente ermittelt und sind in Tabelle 4.2 als Zahlenwerte dokumentiert. Fehlerbalken stellen S.E.M. der mindestens drei Einzelversuche, bei *EcFocA* Standardabweichung der technischen Replikate dar. Prokaryoten-FNTs können kein L-Laktat transportieren, Eukaryoten-FNTs sind dazu in der Lage.

Tabelle 4.2: Gemessene initiale-Transportraten [$s^{-1} \cdot 1000^{-1}$] verschiedener Substrate an unterschiedlichen FNTs bei pH 6,8.

Protein	Formiat	Acetat	L-Laktat
<i>BtFdhC1</i>	4,65 ± 0,72	4,70 ± 2,60	0,00 ± 0,52
<i>EcFocA</i>	1,53 ± 0,11	3,70 ± 0,10	0,00 ± 0,00
<i>EhFNT</i>	3,80 ± 1,52	3,44 ± 0,92	1,77 ± 0,39
<i>PffFNT</i>	3,18 ± 0,64	3,41 ± 0,92	1,55 ± 0,20

Alle untersuchten FNTs transportierten Formiat und Acetat, wohingegen L-Laktat nur von eukaryotischen FNTs, *EhFNT* und *PffFNT* und nicht von prokaryotischen FNTs, *BtFdhC1* und *EcFocA* transportiert wurde.

Da *EhFNT* möglicherweise auch Propionat als Substrat nutzen kann (57) wurde für *EhFNT*-, *BtFdhC1*- und Leerliposomen in einem Experiment untersucht, ob die FNTs ein erweitertes Substratspektrum haben. Die Dicarboxylat-Leitfähigkeit von FNTs wurde mit Malonat-Gradienten untersucht. Für diesen Versuch wurden NaCl (Negativkontrolle), Formiat (Positivkontrolle), Propionat und Malonat als 20 mM Gradient in der *stopped-flow*-Apparatur mit Liposomen in Liposomen-Puffer I (20 mM HEPES pH 6,8) vermessen (Abbildung 4.20).

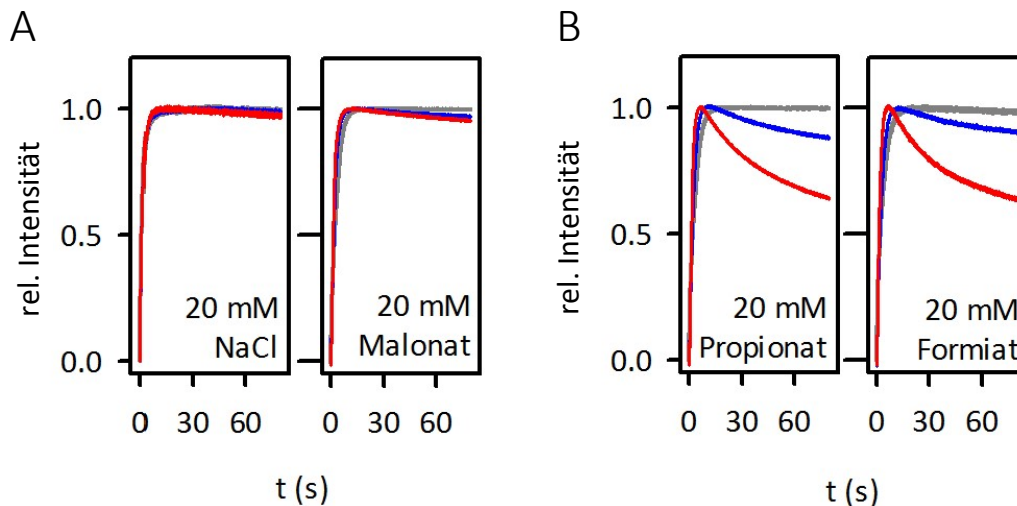


Abbildung 4.20: Streulichtmessung von FNT-Proteoliposomen mit Natriumchlorid-, Malonat-Gradienten (A) oder Propionat- und Formiat-Gradienten (B) bei pH 6,8 in *stopped-flow*-Apparatur. Dargestellt sind Kurven eines Einzelexperimentes von *BtFdhC1*- (blau), *EhFNT*- (rot) und Leerliposomen (grau).

Die Negativkontrolle Natriumchlorid zeigte ebenso wie Malonat keinen oder nur schwachen Einstrom in *EhFNT*- und *BtFdhC1*-Liposomen (Abbildung 4.20 A). Propionat und Formiat wurden von beiden FNTs in gleicher Weise wie die Positivkontrolle Formiat transportiert (Abbildung 4.20 B). Die für *EhFNT*-Liposomen ermittelten initialen Einstromraten von Formiat ($19,0 \text{ s}^{-1}$) und Propionat ($14,9 \text{ s}^{-1}$) waren verhältnismäßig hoch, möglicherweise chargenbedingt. *BtFdhC1*-Liposomen zeigten Einstromraten von $6,5 \text{ s}^{-1}$ für Formiat und $5,4 \text{ s}^{-1}$ für Propionat. Die ermittelten Malonat-Einstromraten lagen bei $0,97 \text{ s}^{-1}$ für *EhFNT*- und $1,1 \text{ s}^{-1}$ für *BtFdhC1*-Liposomen.

4.4.3 Untersuchung der Affinität und Transportkapazität von *EhFNT*

Um zu testen, ob FNTs ohne zentrales Histidin die FNT-typische niedrige Substrataffinität aufweisen, wurde *EhFNT* als Modell-FNT untersucht. Dafür wurden gemäß der Vorschrift in 3.4.3.3 Streulicht-Messungen an *EhFNT*- und Leerliposomen in der *stopped-flow*-Apparatur mit verschiedenen Acetat-Gradienten von 15-200 mM durchgeführt.

Die normalisierten Kurven sind in Abbildung 4.21 dargestellt. Es wurde eine Zunahme der gemessenen Transportrate beobachtet (Abbildung 4.22 A). Außerdem wurde eine Abnahme des Signalrauschens mit steigender Gradientenstärke von 8,9 % bei 15 mM gegenüber 4,4 % bei 200 mM Acetat gemessen. Ebenso verhält sich der Einfluss des passiven Acetattransports über die Leerliposomenmembran. Die für Leerliposomen bestimmte initiale Transportrate liegt bei $3,8 \text{ s}^{-1}$ bei 15 mM gegenüber 0 s^{-1} bei 200 mM Acetat.

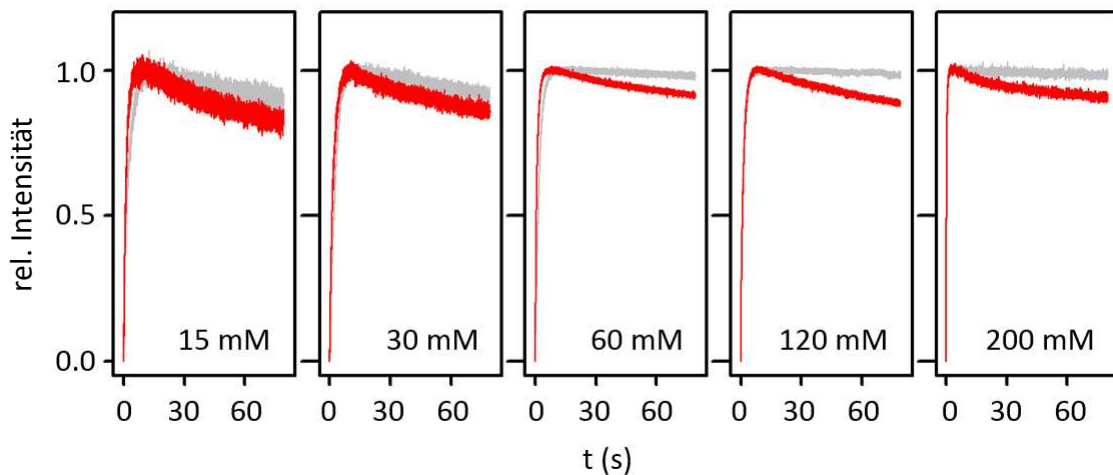


Abbildung 4.21: Streulichtmessung von Acetat-Einstrom von verschiedenen Gradienten (15-200 mM) in *EhFNT*-Liposomen (rot) und Leerliposomen (grau) bei pH 6,8 (n = 1).

Die aus den Kurven in Abbildung 4.21 ermittelten initialen Transportraten der *EhFNT*-Liposomen nahmen mit zunehmenden Substratgradienten nahezu linear zu, die Messbedingungen war demzufolge noch nicht im Bereich der Transport-Sättigung (Abbildung 4.22 A). Die gesamte transportierte Substratmenge, gemessen als relative Transportkapazität, war mit 8-15 % konstant unabhängig vom Substratgradienten (Abbildung 4.22 B).

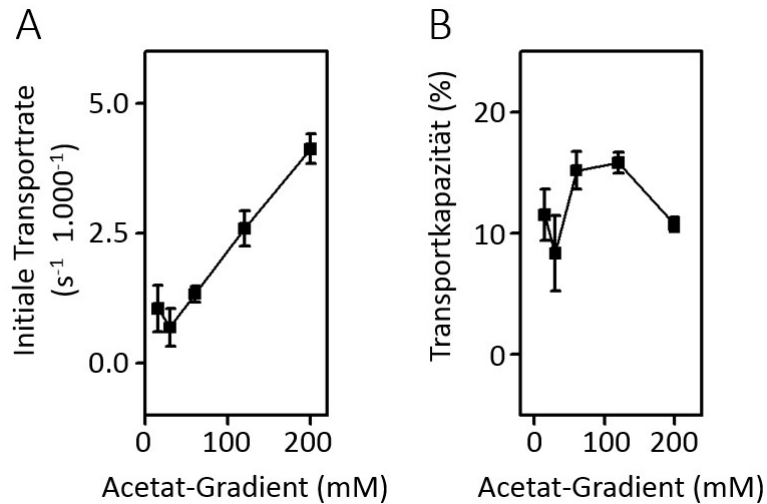


Abbildung 4.22: Initiale Transportrate (A) und Kapazität (B) von Acetat-Einstrom in *EhFNT*-Liposomen bei verschiedenen Gradienten bei pH 6,8. Technischer Fehler von mindestens 3 Replikaten als Standardabweichung dargestellt.

4.4.4 Untersuchung der Funktionsweise von FNTs ohne zentrales Histidin

4.4.4.1 Untersuchungen der Aufnahme durch *EhFNT*_N283H-Mutante

Um die Rolle des zentralen Asparagins N283 in *EhFNT* zu beleuchten, wurde eine Mutante genutzt, die an dieser Stelle ein Histidin besitzt (*EhFNT*_N283H Mutation). Das zellfrei hergestellte Protein wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot nachgewiesen (Abbildung 4.9). Das in Liposomen rekonstituierte *EhFNT*_N283H zeigte ebenso wie Leerliposomen im Streulichtversuch an der *stopped-flow*-Apparatur keine Formiat-Transportfunktion, die Positivprobe *PfFNT* hingegen schon (Abbildung 4.23). Dieser Liposomenansatz wurde mit Liposomen-Puffer II (200 mM Saccharose, 100 mM KCl, 5 mM MES, 5 mM HEPES pH 6,8) hergestellt.

Ergebnisse

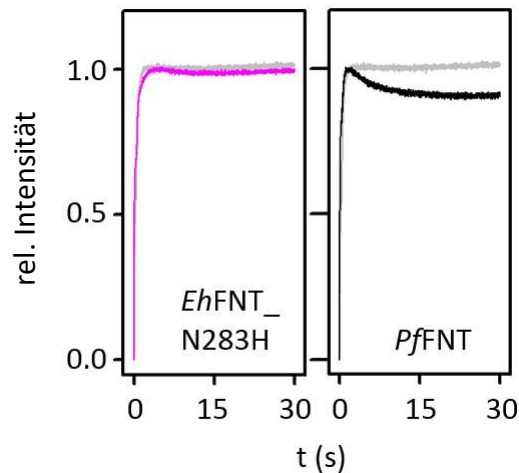


Abbildung 4.23: Streulichtmessung von 200 mM Formiat-Gradient-Einstrom in *EhFNT_N283H*-Liposomen (pink), *PfFNT*-Liposomen (schwarz, Positivkontrolle) und Leerliposomen (grau, Negativkontrolle) bei 6,8. Dargestellt sind Mittelwertkurven einer Doppelbestimmung. Alle Liposomen wurden aus derselben Lipid-Charge unter selben Bedingungen hergestellt. Da es nach 30 Sekunden zum Platzen der Liposomen kam, ist nur dieser Zeitraum dargestellt.

4.4.4.2 Untersuchung der Abhängigkeit der Formiat-Aufnahme in FNT-Liposomen vom pH-Gradienten

Der Einfluss eines Protonengradienten auf die Formiat-Aufnahme von *EhFNT*- und *PfFNT*-Proteoliposomen wurde im Streulichtversuch an der *stopped-flow*-Apparatur nach der Anleitung in 3.4.3.3 untersucht. Dafür wurden drei verschiedene Protonengradienten bei gleichbleibendem, von außen ins Liposomeninnere gerichtetem 200 mM Formiat-Gradienten erzeugt.

Im ersten Versuchsteil wurden die bei pH 6,8 hergestellten Liposomen so mit gleichen Volumina verschiedener Formiat-Gradienten-Lösung gemischt, dass kein von außen nach innen gerichteter Protonengradient erzeugt wurde ($c(\text{H}^+_{\text{au\ss en}}) / c(\text{H}^+_{\text{innen}}) = 1$, innen und außen pH 6,8). Durch Mischung mit einer pH 4,4 sauren Gradienten-Lösung wurde ein von außen nach innen gerichteter ($c(\text{H}^+_{\text{au\ss en}}) / c(\text{H}^+_{\text{innen}}) = 100$, außen pH 4,8) und durch Mischen mit pH 9,2 basischer Gradienten-Lösung ein von innen nach außen gerichteter ($c(\text{H}^+_{\text{au\ss en}}) / c(\text{H}^+_{\text{innen}}) = 0,1$, außen pH 7,8) Protonengradient erzeugt. Die dabei erfassten Streulichtkurven sind in Abbildung 4.24 dargestellt. War der erzeugte Protonengradient dem Substratgradienten gleichgerichtet, wurde eine Steigerung der initialen Transportrate und der Transportkapazität gegenüber abwesenden Protonengradienten beobachtet. War der Protonengradient dem Substratgradienten entgegen gerichtet, so konnte kein Transport beobachtet werden. Die aus den Streulichtkurven ermittelten initialen Transportraten und Transportkapazitäten sind in Abbildung 4.24 dargestellt.

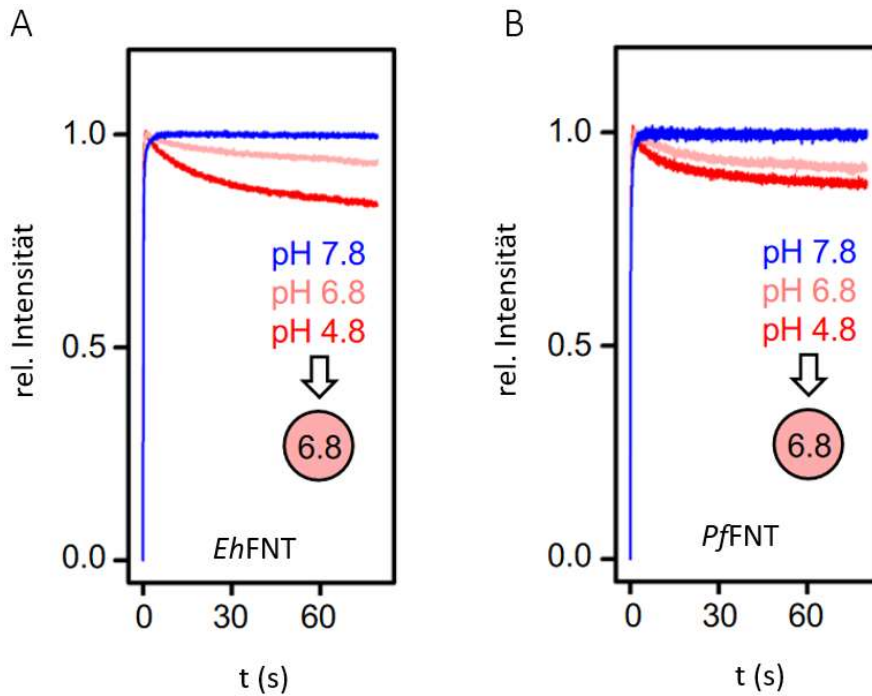


Abbildung 4.24: Streulichtmessung von 200 mM Formiat-Gradient-Einstrom in (A) *EhFNT*- und (B) *PffNT*-Liposomen bei initialen pH-Werten von intern 6,8 und extern 7,8 (blau), 6,8 (hellrot) und 4,8 (rot) mit den erzeugten Protonengradienten ($c(\text{H}^+_{\text{au\ss}en}) / c(\text{H}^+_{\text{innen}})$) in genannter Reihenfolge von 0,1, 1 und 100. Normierte Mittelwertkurven von mindestens drei Messungen sind abgebildet, wobei jede Messung 3-9 Einzelmessungen enthält.

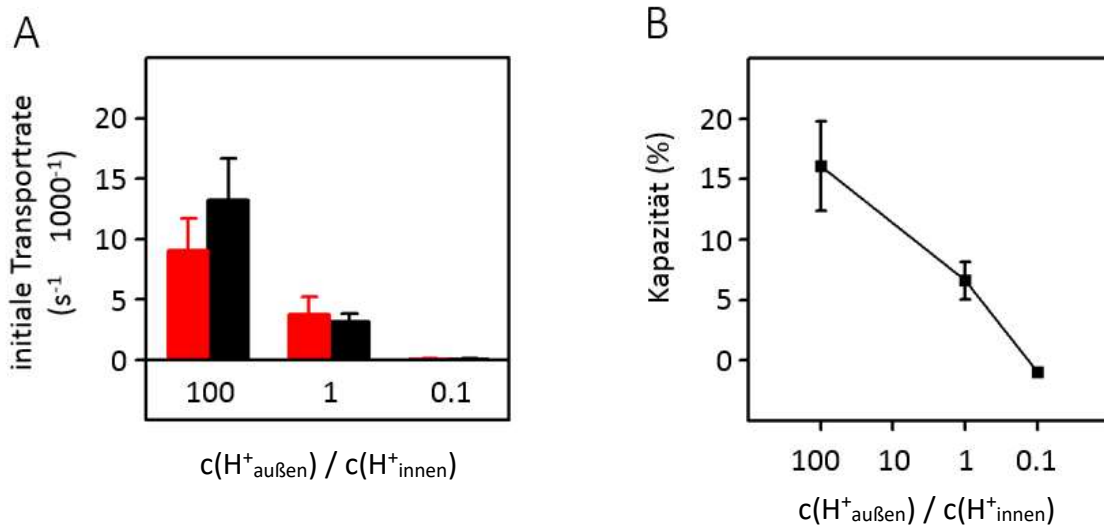


Abbildung 4.25: (A) Initiale Formiat-Transportrate bei verschiedenen Protonengradienten von *EhFNT*- (rot) und *PffNT*- (schwarz) Proteoliposomen und (B) relative Kapazitäten von *EhFNT*-Proteoliposomen bei Streulicht-Messungen mit 200 mM Formiat-Gradienten. Der initiale interne pH-Wert lag bei 6,8. Es wurden mindestens drei Kurven ausgewertet, wobei jede Kurve aus 3-9 Einzelmessungen bestand. Die Fehler sind als S.E.M. dargestellt.

Ergebnisse

Sowohl *EhFNT*, als auch *PfFNT* zeigten eine protonengradientenabhängige Transportfunktion, mit Zunahme bei von außen nach innen gerichtetem Protonengradienten. Um auszuschließen, dass die beobachtete Transportzunahme bei Ansäuerung des äußeren Kompartiments durch den geänderten Protonierungszustand der FNT-Proteine, des Substrates oder der Phospholipide zustandekommt, wurde die Versuchsreihe mit *EhFNT*-Proteoliposomen unter geänderten Bedingungen wiederholt.

Dafür wurden im zweiten Versuchsteil Liposomen bei pH 4,8 hergestellt. Durch Mischung dieser Liposomen mit Formiat-Gradienten-Lösung gleichen pH-Wertes in der *stopped-flow*-Apparatur und der Erfassung der Streulichtkurven wurde der Transport ohne transmembranären Protonengradienten untersucht ($c(\text{H}^+_{\text{au\ss en}}) / c(\text{H}^+_{\text{innen}}) = 1$). Durch Mischung der Liposomen mit pH 2,7 saurer Formiat-Gradienten-Lösung wurde ein äußerer pH-Wert von 2,8 und somit ein von außen nach innen gerichteter Protonengradient erzeugt ($c(\text{H}^+_{\text{au\ss en}}) / c(\text{H}^+_{\text{innen}}) = 100$). Die Streulichtkurven sind in Abbildung 4.26 A dargestellt. Es kam durch den erzeugten Protonengradienten zu einem ähnlichen Anstieg der Transportrate und -kapazität (Abbildung 4.26 B und C), wie beim vorigen Versuchsteil mit initialem pH-Wert von 6,8 im Liposomeninneren (Abbildung 4.25). Dieses Experiment wurde vom Master-Studenten Bastian Höger durchgeführt.

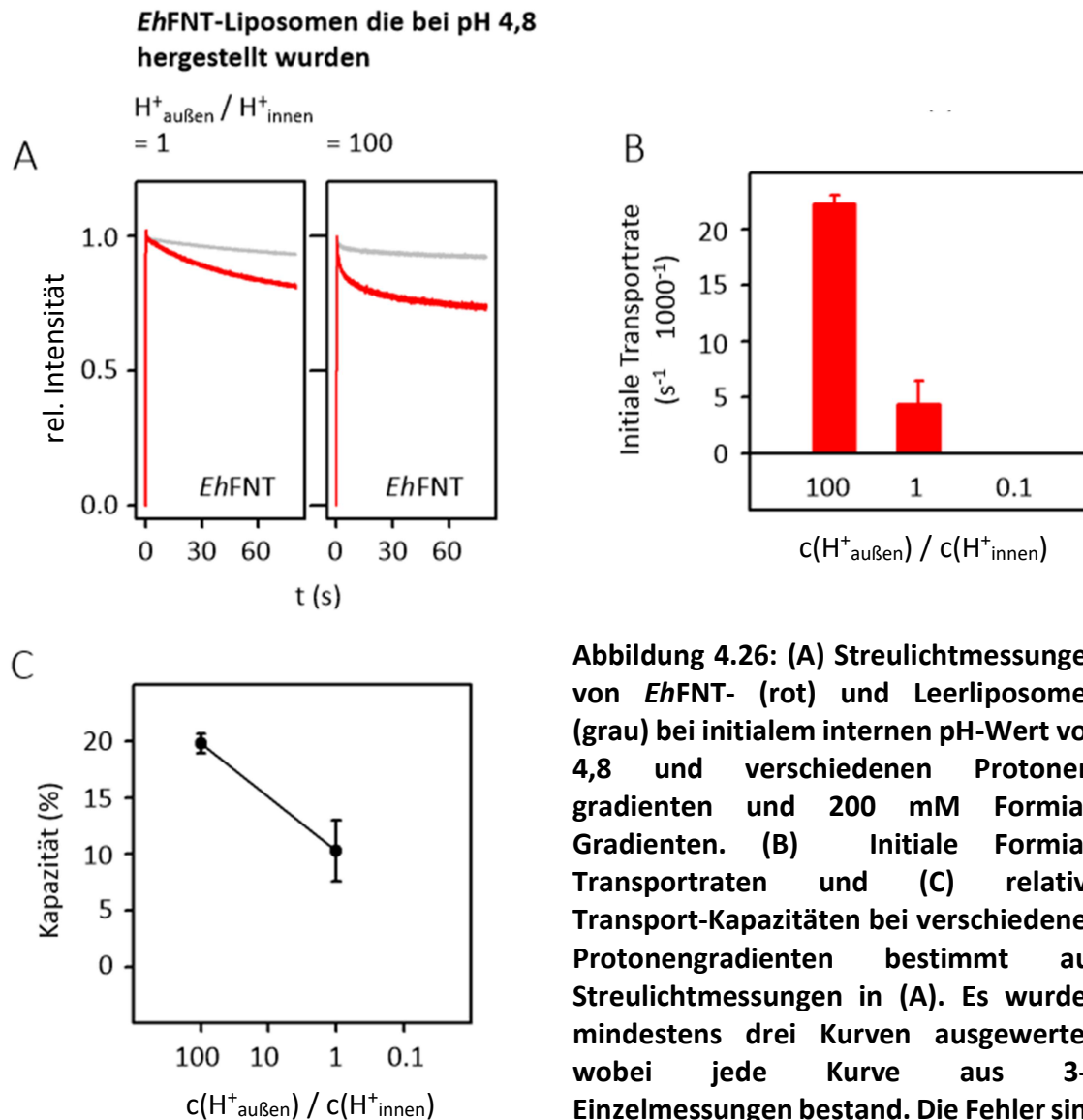


Abbildung 4.26: (A) Streulichtmessungen von *EhFNT*- (rot) und Leerliposomen (grau) bei initialem internen pH-Wert von 4,8 und verschiedenen Protonengradienten und 200 mM Formiat-Gradienten. (B) Initiale Formiat-Transportraten und (C) relative Transport-Kapazitäten bei verschiedenen Protonengradienten bestimmt aus Streulichtmessungen in (A). Es wurden mindestens drei Kurven ausgewertet, wobei jede Kurve aus 3-9 Einzelmessungen bestand. Die Fehler sind als S.E.M. dargestellt.

4.4.4.3 Untersuchung der pH-Änderung durch Substrattransport in FNT-Liposomen mit pH-sensitiven Fluorophoren

Der direkte Nachweis des Proton-Substrat-Symports von FNTs ohne zentrales Histidin war ein Ziel dieser Arbeit. Dafür benötigt man eine Methode, die die intraliposomale pH-Wert-Änderung in FNT-Proteoliposomen detektiert. Das Einbringen einer Elektrode in die ca. 150 nm kleinen Liposomen ist dabei technisch ausgeschlossen. Aufgrund des kleinen Innenvolumens im Verhältnis zum Volumen des umgebenden Mediums ist auch der Nachweis der äußeren Alkalisierung wie in FNT-exprimierenden Hefezell-Suspensionen (15, 3) nicht realisierbar. Eine Möglichkeit, die Änderung der Protonenkonzentration über die Zeit zu erfassen, besteht im Einsatz pH-sensibler Fluorophore wie Pyranin (3.4.2.1) und ACMA (3.4.2.3).

Pyraninbeladene Proteoliposomen

Die pyraninbeladenden Liposomen wurden nach dem Protokoll 3.4.2.1 hergestellt. Die erfolgreiche Isolierung pyraninbeladender Liposomen wurde durch Fluoreszenzuntersuchungen festgestellt (Abbildung 4.27).

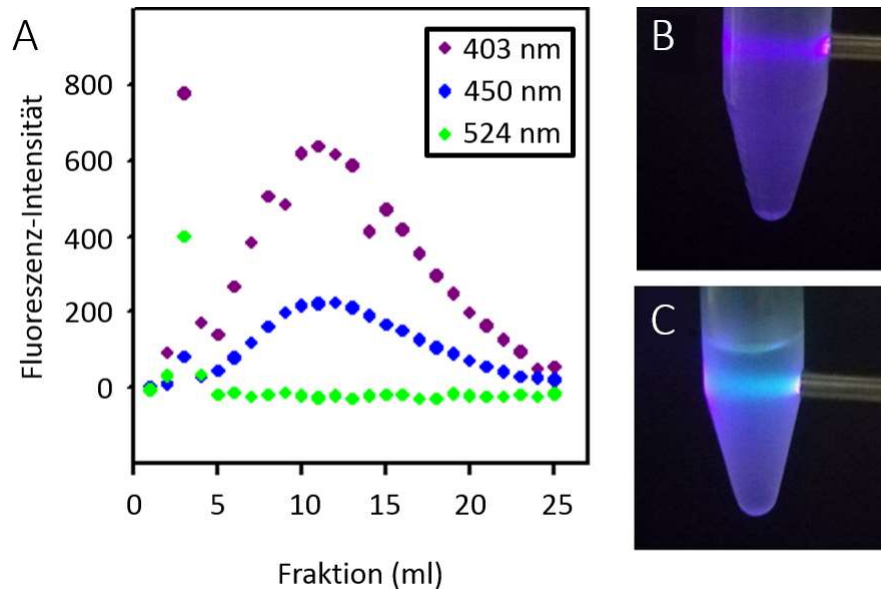


Abbildung 4.27: (A) Fluoreszenzmessung der bei der Größenausschlusschromatographie erhaltenen Fraktionen. In der Legende dargestellt sind die verwendeten Anregungswellenlängen. Die Bestrahlung bei 524 nm (Anregungs- und Emissionswellenlänge, grün) zeigt das von Liposomen gestreute Licht. Sie befanden sich vorwiegend in der 3 ml-Fraktion. Die Emission bei 512 nm des protonierten Pyranins (403 nm Anregung, violett) und des deprotonierten Pyranins (450 nm Anregung, blau) zeigten, dass sich in der Liposomen-Fraktion Pyranin befand. Das freie Pyranin eluierte ab 5 ml. (B und C) Bestrahlung von Liposomensuspensionen mit Licht der Wellenlänge 403 nm. (B) Einfache Liposomen, Streulicht. (C) Pyraninbeladene Liposomen mit *Stokes-Shift*. Aufgenommen mit der Licht-Quelle der *stopped-flow*-Apparatur.

Die Anregungs- und Emissions-Wellenlängenscans des Pyranins in Liposomen bei pH 6,8 (Abbildung 4.28) entsprachen den Literaturangaben für freies und in Liposomen eingebautes Pyranin in diesem pH-Bereich (Abbildung 3.4 B) (94).

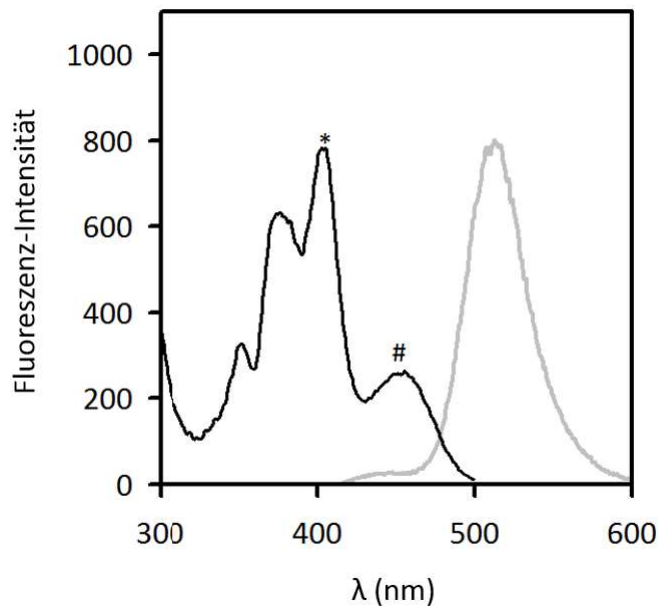


Abbildung 4.28: Anregungs- und Emissionsspektrum (schwarz und grau) von pyraninbeladenen Leerliposomen in Liposomen-Puffer II (200 mM Saccharose, 100 mM KCl, 5 mM HEPES, 5 mM MES, pH 6,8). Das Absorptionsmaximum der protonierten Form liegt bei 403 nm (*) und das der deprotonierten Form bei 450 nm (#). Beide Formen haben ihr Emissions-maximum bei 512 nm, was den Angaben in der Literatur entspricht (Abbildung 3.4 B) (92, 94).

Pyraninbeladene *PffFNT*- und *EhfFNT*-Proteoliposomen (in Liposomen Puffer II) zeigten bei Streulichtmessungen im *stopped-flow*-Versuch keine Formiat-Transportfunktion bei pH 6,8 (Abbildung 4.29 A). Durch Zugabe von 25 μ l 4,2 M Formiat-Gradienten-Lösung II (pH 6,8) zu 500 μ l *EhfFNT*- und Leer-Liposomen in der Fluorimeter-Küvette wurde ein 200 mM Gradient erzeugt. Es zeigte sich während der Fluoreszenzanalyse kein unterscheidbares Verhalten bei Anregung bei 450 nm und Emission bei 512 nm (Abbildung 4.29 B). Eine mögliche inhibitorische Wirkung von Pyranin auf *PffFNT*-exprimierenden *S. cerevisiae*-Zellen (3.5) konnte mit dem von Dr. André Gollack (20) etablierten Inhibitor-Assay mit ^{14}C -radiomarkiertem Formiat bei pH 6,8 von Anna Meier in unserem Labor nicht nachgewiesen werden. Dafür wurde bei *PffFNT*-exprimierenden Hefe-Zellen, die mit 1 mM Pyranin für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden, durch Substratzugabe über 30 s die Formiat-Aufnahme in die Zellen gemessen. Dabei konnte für die mit Pyranin behandelten Hefe-Zellen die gleiche Formiat-Aufnahme wie bei unbehandelten Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die fehlende Funktionalität von pyraninbeladenen Proteoliposomen ließ keine Betrachtung des Proton-Substrat-Symports durch FNTs zu. Da im Hefe-Zellversuch keine Inhibition von *PffFNT* durch Pyranin beobachtet wurde, wurde ein Einfluss des Pyranins auf die

Transportfunktion von FNTs nicht nachgewiesen. Die Orientierung der *Pf*FNT-Proteine in der Hefezelle war dabei umgekehrt wie in *Pf*FNT-Liposomen (40). Die Zugabe von Pyranin zur Hefezellsuspension und der Einbau von Pyranin in *Pf*FNT-Liposomen ermöglichten also den Kontakt des Pyranins zur selben Seite des FNTs und hätten im Falle einer inhibitorischen Wirkung des Fluorophors in beiden Fällen zu einem Transportverlust geführt.

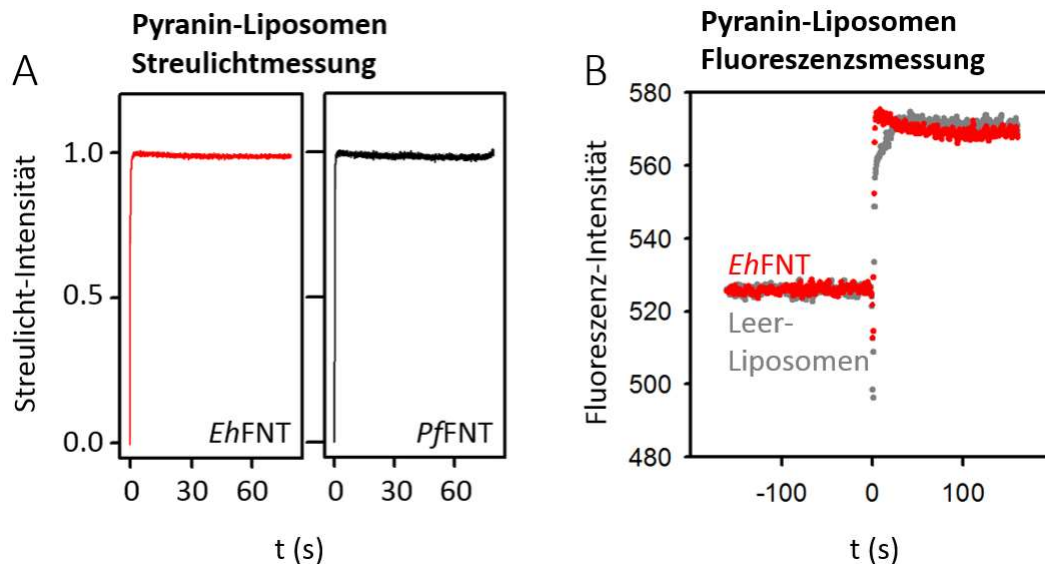


Abbildung 4.29: (A) Streulichtmessung von pyraninbeladenen FNT-Liposomen (200 mM Saccharose, 100 mM KCl, 5 mM HEPES, 5 mM MES) mit 200 mM Formiat bei pH 6,8. Sowohl die *Eh*FNT- (rot) als auch die *Pf*FNT- (rot, Positivkontrolle) Proteoliposomen und die Leerliposomen (grau, Negativkontrolle) zeigten keine Transportaktivität (n = 3). (B) Fluoreszenz-Messung der pyraninbeladenen *Eh*FNT- und Leerliposomen. Anregung bei 450 nm (Erfassung der deprotonierten Moleküle), Emission bei 512 nm registriert. Nach Zugabe von 200 mM Formiat-Gradient lässt sich kein unterschiedliches Verhalten zwischen *Eh*FNT- und Leerliposomen feststellen (n = 1).

Pyranin war aus ungeklärten Gründen für den Nachweis des Proton-Substrat-Symports durch FNTs ungeeignet. Es konnte allerdings mit Hilfe von pyraninbeladenen Leerliposomen in Anlehnung an Nilsson *et al.* (105) und Paxton *et al.* (98, 97) überprüft werden, wie stabil die Liposomenmembran gegenüber angelegten pH-Gradienten war (siehe Kapitel Methodenoptimierung 4.6.3).

Um die angestrebte Untersuchung der Änderung des Protonengradienten in Folge von Proton-Substrat-Symport in FNT-Proteoliposomen zu ermöglichen, wurde deshalb ein alternatives pH-sensitives Fluorophor (ACMA) gewählt.

ACMA-beladene Proteoliposomen

Bei Zugabe von ACMA zu Liposomen verteilt sich dieses pH-sensitive Fluorophor über seine neutrale Form in die Liposomen und die Liposomenmembran (3.4.2.3). Die protonierte, geladene Form des ACMA liegt dabei in den wässrigen Kompartimenten, die neutrale Form in der lipophilen Membran vor. Es entsteht ein vom pH-Gradienten abhängiges Fließgleichgewicht an protoniertem ACMA zwischen den beiden wässrigen Kompartimenten. Aufgrund eines Substrat-Proton-Symports in Liposomen kommt es zur Senkung des pH-Wertes und zur Anreicherung der protonierten ACMA-Moleküle im Inneren der Liposomen. Dabei werden die in den Liposomen befindlichen Fluorophor-Moleküle gequencht. Demnach kommt es bei Ansäuerung des Liposomeninneren gegenüber dem äußeren Medium zu einem Abfall des Fluoreszenzsignals, da nur die ACMA-Moleküle im äußeren Medium erfasst werden, deren Konzentration während des Transports sinkt (100, 102, 105).

In einem Vorversuch wurde zunächst überprüft, ob ACMA in Liposomen gleiche fluorimetrische Eigenschaften zeigt wie in Lösung (Abbildung 3.7) und in seinem Verhalten den Literaturangaben entspricht (106, 103, 102). 500 μ l ACMA-beladene Liposomen, die bei pH 6,8 hergestellt wurden, wurden mit 2 μ l 1 M HCl versetzt. Dadurch wurde der pH-Wert des äußeren Kompartimentes von 6,8 auf 6,0 gesenkt. Es kam dabei zu einer Zunahme der anregbaren Moleküle und der gemessenen Emission. (Abbildung 4.30). Diese lässt sich durch die Umverteilung von ACMA aus dem Liposomeninneren ins äußere Kompartiment erklären.

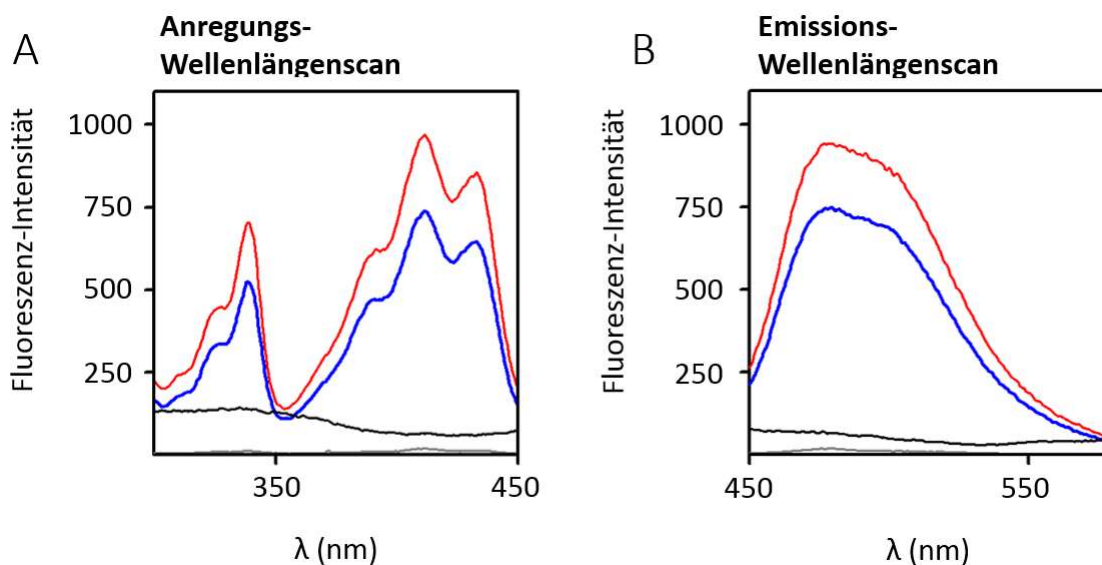


Abbildung 4.30: (A) Anregungswellenlängen- und (B) Emissionswellenlängenscan ($\lambda_{\text{ex}} = 410 \text{ nm}$) von bei pH 6,8 hergestellten ACMA-beladenen Leerliposomen. Puffer (hellgrau) und Leerliposomen ohne ACMA (schwarz) haben bei pH 6,8 keinen Einfluss auf die Messung. Die Anregung und Emission von AMCA-beladenen-Leerliposomen waren beim äußeren pH-Wert von 6,8 (blau) geringer als nach Senkung auf pH 6,0 (rot).

Um den durch Proton-Substrat-Symport gebildeten Protonengradienten zwischen FNT-Proteoliposomeninneren und -äußeren nachzuweisen, wurde zunächst das bereits gut beschriebene FNT-Protein *EcFocA* genutzt. *EcFocA*-Proteoliposomen, die im *stopped-flow*-Versuch Funktionalität aufwiesen (siehe Abbildung 4.16 Abbildung 4.18), wurden gemäß der Vorschrift in 3.4.2.4 mit ACMA beladen. Die Untersuchungen fanden im Fluorimeter unter den unter 3.4.3.4 beschriebenen Bedingungen statt. Bei der Zugabe von 160 mM Substratgradient zum äußeren Medium kam es für Formiat- und Acetat-Gradienten zu unterschiedlichem Verhalten von FNT- und Leerliposomen. Dabei kam es bei Leerliposomen zu einem leichten Anstieg, bei *EcFocA*-Liposomen zu einem starken Anstieg des Fluoreszenzsignals über die Zeit (Abbildung 4.31 A und B).

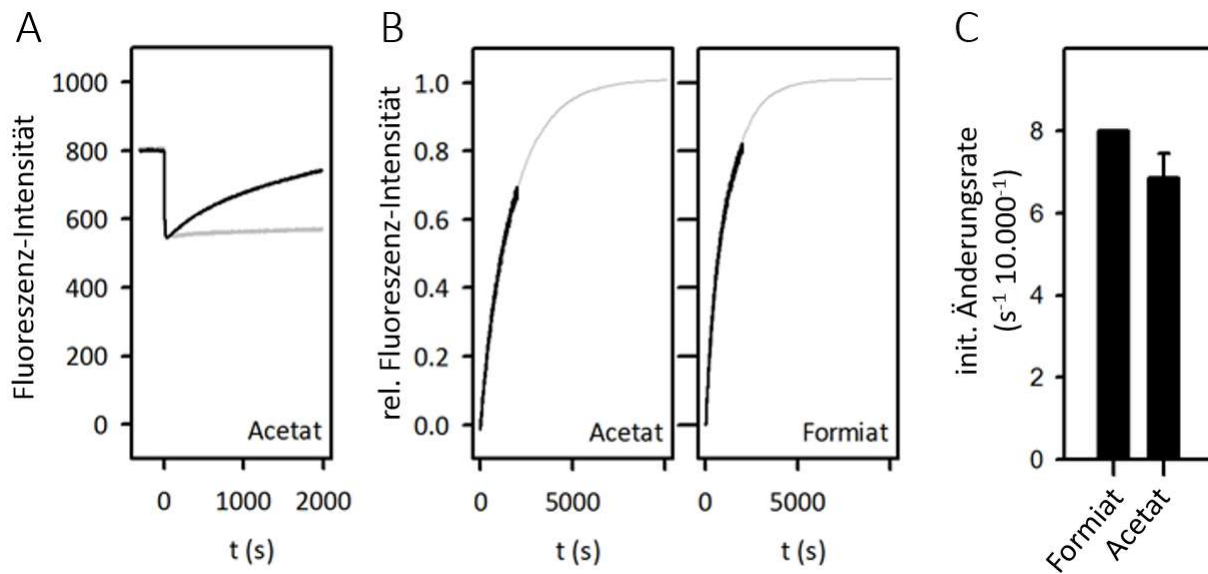


Abbildung 4.31: (A) Fluoreszenz-Intensitäts-Änderung von ACMA-haltigen *EcFocA*-Liposomen (schwarz) und Leerliposomen (grau) nach Zugabe von 160 mM Na-Acetat in äußeres Medium bei $t = 0$, Rohdaten. (B) Normierte Fluoreszenzkurven von *EcFocA*-Proteoliposomen (Leerliposomen abgezogen, schwarz) und das zugehörige *fitting* (grau) für Formiat und Acetat. (C) Die initialen Fluoreszenzänderungsraten ermittelt aus Kurven wie in (B) für Formiat ($n = 1$) und Acetat ($n = 2$).

Die beobachteten Kurven mit einem transportabhängigen Fluoreszenzanstieg ließen sich für die eukaryotischen FNTs *EhFNT* und *PfFNT* wiederholen (Abbildung 4.32 A und B), wobei es hier scheinbar zu einer chargenabhängigen Undichtigkeit der Liposomen kam. Die aus den Fluoreszenzkurven ermittelten Formiat-Transportraten sind in Abbildung 4.32 C dargestellt.

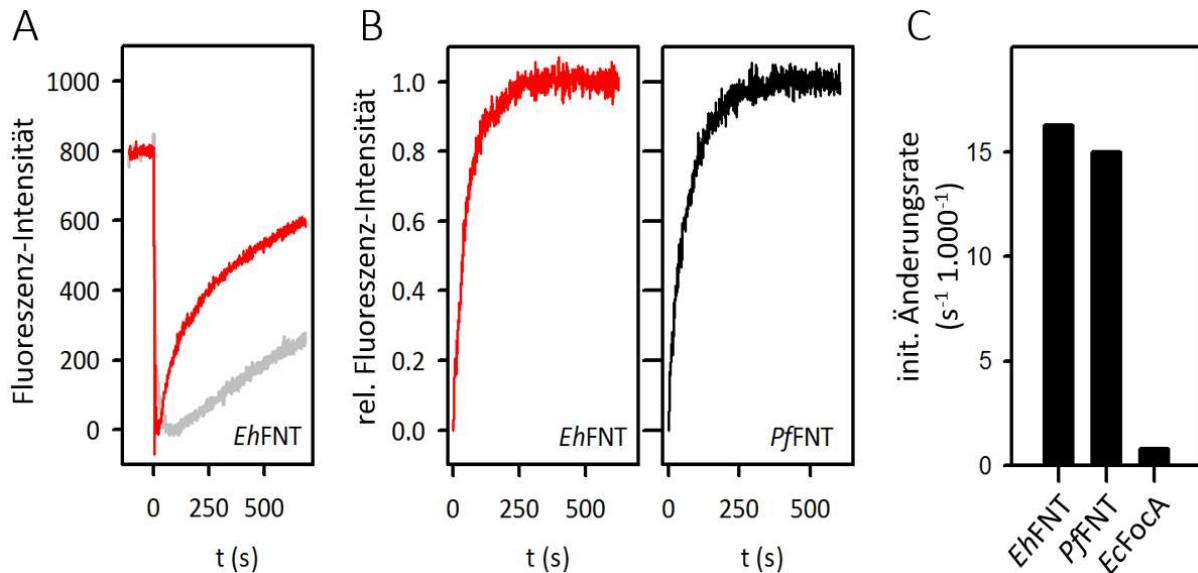


Abbildung 4.32: (A) Fluoreszenzänderung von ACMA-haltigen *EhFNT*-Proteoliposomen (schwarz) und Leerliposomen (grau) nach Zugabe von 160 mM Na-Formiat in äußeres Medium bei $t = 0$, Rohdaten. (B) Normierte Fluoreszenzkurven von Formiat-Messung an *EhFNT*- (rot) und *PfFNT*-Proteoliposomen (schwarz) mit abgezogenen Werten von Leerliposomen. (C) Die initialen Fluoreszenzänderungsraten ermittelt aus Kurven in (B) für *EhFNT*, *PfFNT* und Abbildung 4.31 B für *EcFocA* ($n = 1$).

Alle untersuchten ACMA-beladenen FNT-Proteoliposomen zeigten nach Zugabe von 160 mM Substrat zum äußeren Medium einen stärkeren Anstieg des Fluoreszenzsignals als die Leerliposomen, was in Abbildung 4.31 A und Abbildung 4.32 A dargestellt ist. Da auch Leerliposomen einen Fluoreszenzanstieg über die Zeit zeigten, ist anzunehmen, dass dieser Anstieg den Import vom Substratgradient über die Liposomenmembran darstellt. Dieser Effekt beruht auf der Undichtigkeit der Liposomen gegenüber dem Substrat und war chargenabhängig. Bei der Auswertung der FNT-Proteoliposomenkurven wurde der Einstrom in Leerliposomen herausgerechnet. Die ermittelten initialen Transportraten für Formiat-Transport sind in Abbildung 4.31 C und Abbildung 4.32 C wiedergegeben und sind für *EhFNT*-, *PfFNT*- und *EcFocA*-Proteoliposomen 4-, 5- und 0,5-mal so hoch wie die aus den Streulichtversuchen (4.4.1), sie liegen also in vergleichbaren Dimensionen

Es konnte gezeigt werden, dass sich FNTs ohne und mit zentralem Histidin in Bezug auf Transport-Funktionalität (4.4.1), Substratspektrum (4.4.2) und Substrataffinität (4.4.3) ähneln. Beide FNT-Gruppen zeigen zudem einen vom Protonengradienten abhängigen Substrattransport (4.4.4.2).

4.5 Untersuchung der Direktionalität von FNTs

Da die meisten Untersuchungen an FNT-Proteinen durch Substrataufnahme in Zellen durchgeführt wurden (4), wurde bisher zumeist die unphysiologische Transportrichtung, der Substratimport durch FNTs, betrachtet (Ausnahmen: (40, 15, 21, 24)). Die Orientierung der in dieser Arbeit genutzten Proteoliposomen lässt dabei Rückschlüsse auf ihre Direktionalität zu (4.3.3). Außerdem wurde untersucht, ob sich sekretorische Hefe-Vesikel mit FNT anreichern und isolieren lassen, um den Aspekt der Direktionalität von FNTs zu untersuchen.

4.5.1 Herstellung von *Pf*FNT-haltigen Vesikeln aus NY17 *S. cerevisiae*-Zellen

Eine universelle Möglichkeit der Untersuchung der Direktionalität bietet die Nutzung von NY17-Hefen (122). Diese reichern unter bestimmten Wachstumsbedingungen sekretorische Vesikel an. In Vesikeln liegen Membranproteine umgekehrt orientiert vor wie in der äußeren Zellmembran. Substratimport über FNTs in die Vesikel entspricht somit der physiologischen Funktion des Substratexports über die Plasmamembran. Für *Pf*FNT wurde eine Isolierung der Vesikelfraktion durchgeführt.

Für die Herstellung von *Pf*FNT-haltigen sekretorischen Vesikeln aus NY17-Hefezellen wurde *Pf*FNT DNA im pDRTXa-Vektor in Zellen des Hefestammes eingebracht und die Zellen vermehrt (3.1.9). Die Vesikelisolierung erfolgte gemäß der Vorschrift im Abschnitt 3.1.10 und die gewonnenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung sowie Western Blot untersucht (Abbildung 4.33). Dabei zeigte sich, dass sowohl im Gesamtzelllysat als auch im 100.000 *g*-Pellet *Pf*FNT (35 kDa) als Monomer und Dimer mit dem Penta-His-Antikörper nachweisbar war. Die Gesamtintensitäten beider Spuren im Western Blot entsprachen einander trotz stark unterschiedlicher aufgetragener Gesamtproteinmenge. Der Anteil an *Pf*FNT am Gesamtprotein war dabei im 100.000 *g*-Pellet gegenüber dem Gesamtzelllysat um mehr als das 150-fache erhöht.

Die detektierte Anwesenheit von *Pf*FNT im Western Blot, bei gleichzeitiger Abwesenheit von detektierbarem Protein in der Coomassie-Färbung deuten darauf hin, dass im 100.000 *g*-Pellet vor allem *Pf*FNT enthalten ist (Abbildung 4.33). Der Nachweis, dass es sich beim 100.000 *g*-Pellet tatsächlich um sekretorische Vesikel und nicht um das Mikrosom handelt, wurde nicht erbracht.

Ergebnisse

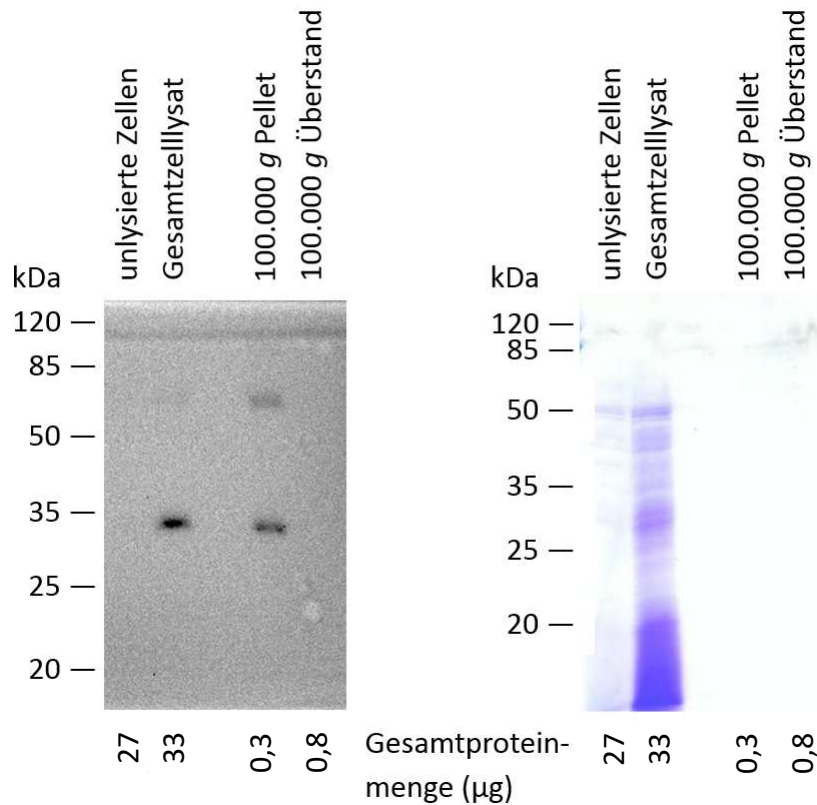


Abbildung 4.33: Herstellungsprozess der PfFNT-haltigen sekretorischen Vesikeln aus NY17-*S. cerevisiae*-Zellen. Der Western Blot (links, Anti-Penta-His-Antikörper, 1 : 5000) zeigt das gebildete PfFNT selektiv an und das unselektiv gefärbte Coomassie-Gel (rechts) zeigt das gesamte Protein an.

Die Herstellung von sekretorischen Vesikeln aus NY17-Hefezellen birgt großes Potential für die Direktionalitätsuntersuchung von Membran-Proteinen, die sich in den Hefe-Zellen ohne Fragmentierung exprimieren lassen. Für die Ziel-Proteine *EhfFNT* und *BtFdhC1* war dies nicht der Fall (4.1), weshalb die Methode der zellfreien Proteinherstellung genutzt wurde.

4.6 Methodenoptimierung: Liposomenherstellung und Dichtigkeit

4.6.1 Einfluss DMSO auf Durchlässigkeit von Liposomen

DMSO ist ein geeignetes Lösungsmittel, um die von Dr. André Gollmack und Björn Henke in unserem Arbeitskreis entdeckten Inhibitoren von *PfFNT* stabil in Lösung zu halten (20). Um eine Untersuchung der potentiell inhibitorischen Wirkung der Inhibitoren auf *EhFNT*-Liposomen zu ermöglichen, war es deshalb nötig, zu evaluieren, ob die Liposomen gegenüber dem Penetrationsvermittler DMSO stabil sind. 1,0 ml Leerliposomen in Liposomen-Puffer I (20 mM HEPES pH 6,8) wurden dafür vor Beginn der Messung mit 0 μ l, 2 μ l, 16 μ l und 36 μ l DMSO versetzt und für 30 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurden eine Streulichtmessung in der *stopped-flow*-Apparatur gegen 20 mM Acetat-Gradienten durchgeführt. In Abbildung 4.34 A sind die verschiedenen Streulicht-Kurven dargestellt, wobei links der initiale, schnelle Wasserausstrom und rechts der gesamte Kurvenverlauf mit dem langsameren Acetat-Einstrom dargestellt sind. Für Wasserausstrom wurden die für diese Betrachtung typischerweise benutzten τ -Werte ermittelt und in Abbildung 4.34 B dargestellt. Je größer der τ -Wert, desto langsamer der Wasserausstrom. Der passive Acetat-Einstrom über die Leerliposomenmembran wurde als initiale Transportrate in Abbildung 4.34 C dargestellt.

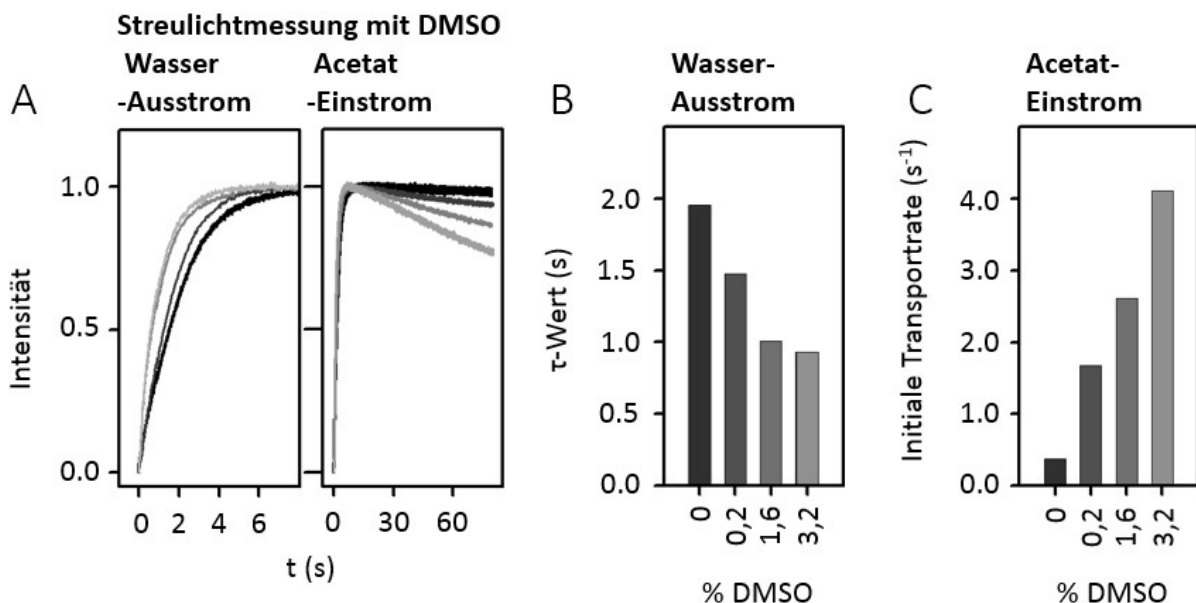


Abbildung 4.34: Streulicht-Messung von Leerliposomen mit 20 mM Acetat-Gradienten. Liposomen wurden unterschiedliche Mengen an DMSO zugemischt: 0 %, 0,2 %, 1,6 % oder 3,2 %. Je heller die Kurve oder der Balken, desto mehr DMSO ist enthalten. (A) Streulichtkurven: links der initiale, schnelle Wasserausstrom über 8 s und rechts die gesamte Streulicht-Messung über 80 s mit Acetat-Einstrom-Signal. (B) τ -Werte des initialen Wasserausstroms und (C) initiale Transportraten des Acetat-Einstroms in Leerliposomen berechnet aus den Kurven in (A). Das Experiment wurde einmal ausgeführt, jede Kurve besteht aus 4-6 technischen Wiederholungen.

Die Liposomen zeigten mit zunehmender DMSO-Konzentration eine verstärkte Durchlässigkeit für Wasser und Acetat. Bei einer 0,2%igen DMSO-Konzentration zeigte sich ein Substrateinstrom über Leerliposomenmembranen, vergleichbar dem des Substrattransports in FNT-Proteoliposomen. Das FNT-Proteoliposomen-System war daher ungeeignet für Inhibitormessungen, die den Einsatz von DMSO in solchen Konzentrationen benötigen. Eine Möglichkeit um das System dennoch für Inhibitor-Versuche nutzbar zu machen, wäre die Verwendung alternativer Lösungsmittel oder hydrophiler Verbindungen.

4.6.2 Einfluss von FNTs auf Wasser-Durchlässigkeit von Liposomen

Während der Streulichtmessungen von Liposomen war zu beobachten, dass die normierten Kurven der FNT-Liposomen einen schnelleren initialen Wasserausstrom als die Leerliposomen aufwiesen. Um zu untersuchen, wie stark sich der initiale Wasserausstrom bei einem 20 mM Substratgradienten von *Pf*FNT- und Leerliposomen bei pH 6,8 unterscheidet, wurden Streulichtkurven in der *stopped-flow*-Apparatur aufgenommen und die für diese Betrachtung typischerweise benutzten τ -Werte ermittelt (je größer der τ -Wert, desto langsamer der Wasserausstrom, reziprok zur initialen Transportrate). Die Herstellung der Liposomen erfolgte dabei in Liposomen-Puffer I (20 mM HEPES, pH 6,8). Diese wurden mit Gradienten-Lösung I (40 mM Substrat in Liposomen-Puffer I) im gleichen Volumen gemischt und die Streulichtkurve über die Zeit erfasst. Es wurden Formiat, Acetat und L-Laktat als Substrat eingesetzt. In Abbildung 4.35 A sind die ersten 4 Sekunden der normierten Streulichtkurven gezeigt, die den initialen Wasserausstroms aufgrund des osmotischen Schocks darstellen. Der gemittelte τ -Wert von allen Substraten lag bei Leerliposomen bei $1,89 \text{ s} \pm 0,01 \text{ s}$, bei *Pf*FNT-Liposomen bei $1,24 \text{ s} \pm 0,16 \text{ s}$ (Abbildung 4.35 B).

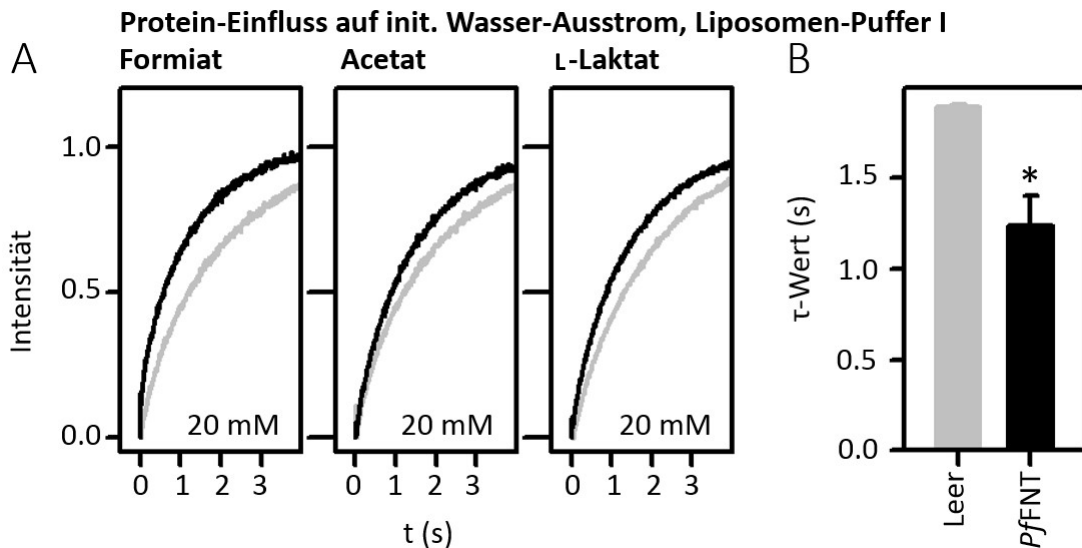


Abbildung 4.35: (A) Streulichtmessung von PffNT- (schwarz) und Leerliposomen (grau). Die ersten vier Sekunden nach Mischen mit 20 mM Substratgradient bei pH 6,8 abgebildet. (B) Durchschnittliche τ -Werte aller Substrate ermittelt aus den Kurven in (A). Die Proteoliposomen zeigen einen signifikanten Abfall des τ -Werts (*, t-Test P = 0,005) gegenüber den Leerliposomen. Die Versuchsreihe wurde einmal durchgeführt. Jede dargestellte Kurve enthält 4-7 technische Replikate.

Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Wasserpermeabilität unter den gewählten Bedingungen durch Proteinrekonstitution signifikant steigt (f-Test P = 0,005). Der Versuch wurde mit Liposomen wiederholt, die in Liposomen-Puffer II (200 mM Saccharose, 100 mM Kaliumchlorid, 5 mM HEPES, 5 mM MES, pH 6,8) hergestellt und mit Gradientenlösung II (erzeugt 200 mM Substratgradient) vermessen wurden, um zu ermitteln, ob auch bei diesen Bedingungen die Wasserpermeabilität durch Proteineinbau erhöht wird (Abbildung 4.36).

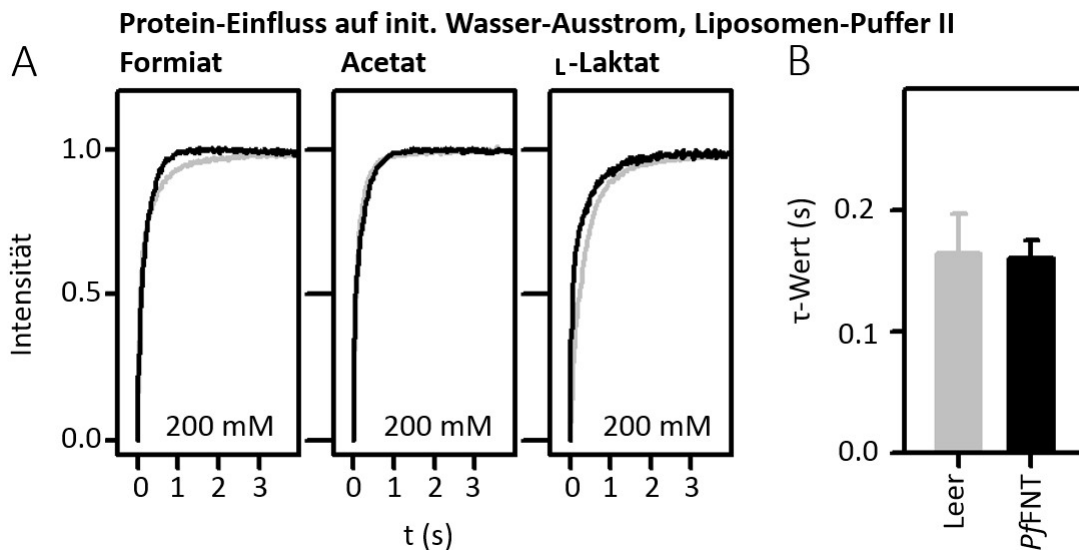


Abbildung 4.36: (A) Streulichtmessung von PfFNT- (schwarz) und Leerliposomen (grau). Erste 4 Sekunden nach Mischen mit 200 mM Substratgradient bei pH 6,8 abgebildet. (B) Durchschnittliche τ -Werte aller Substrate ermittelt aus den Kurven in (A). Die Proteoliposomen zeigen keinen signifikanten Abfall des τ -Werts (t-Test $P = 0,887$) gegenüber den Leerliposomen. Die Versuchsreihe wurde einmal durchgeführt. Jede dargestellte Kurve enthält 4-8 technische Replikate.

Die Erhöhung des Gradienten von 20 auf 200 mM führte zu einem schnelleren Ausstrom von Wasser nach dem initialen osmotischen Schock, weshalb die Liposomen durch den initialen osmotischen Schock unter diesen Bedingungen schneller schrumpften. Der über alle Substrate gemittelte τ -Wert betrug für Leerliposomen $0,164 \text{ s} \pm 0,033 \text{ s}$, bei PfFNT-Liposomen $0,160 \text{ s} \pm 0,15 \text{ s}$. PfFNT-Proteoliposomen zeigten keinen signifikant schnelleren Wasserausstrom als Leerliposomen ($P = 0,887$). Durch Mischen von Liposomen in Liposomen-Puffer II und Gradienten-Lösung II konnte der zuvor bei normierten Streulichtkurven beobachtete Effekt des verstärkten initialen Wasserausstroms durch Proteineinbau in Liposomen aufgehoben werden.

4.6.3 Protonen-Dichtigkeit von Liposomen

Der direkte Nachweis eines Proton-Substrat-Symports in FNT-Proteoliposomen könnte durch die Nutzung von pH-sensitiven Fluorophoren möglich sein. Da Liposomen in Abhängigkeit ihrer Membran-Zusammensetzung (123, 99) und des gewählten Puffers (124) unterschiedliche Membrangängigkeit für Protonen und deren Gegenionen aufweisen, war es für die Realisierung eines solchen Versuchs zunächst nötig, die Eignung des gewählten Systems zu überprüfen.

Zur Untersuchung der Membrangängigkeit von Protonen und deren Gegenionen wurden 500 μl pyraninbeladene Liposomen, die unter verschiedenen Bedingungen hergestellt wurden, nach Aufnahme einer *baseline* mit 19,3 μl isotoner 20 mM KOH versetzt und dadurch ein pH-Wert des äußeren Kompartiments von 10,8 generiert. Die Änderung des pH-Wertes

innerhalb der Liposomen über die Zeit wurde gemäß bereits beschriebener Methoden (105) fluorimetrisch beobachtet (3.4.3.4). Dabei wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm angeregt (deprotonierte Form des Pyranins) und die Emission bei einer Wellenlänge von 512 nm gemessen. Die eingesetzten Liposomen wurden in verschiedenen Puffern (Liposomen-Puffer I, Liposomen-Puffer I + 50 mM K_2SO_4 , Liposomen-puffer II) und mit unterschiedlichen Cholesterin-Anteil von 0 %, 33 % und 50 % (m/m bezogen auf Lipidanteil) nach Protokoll (3.4.2.1) hergestellt.

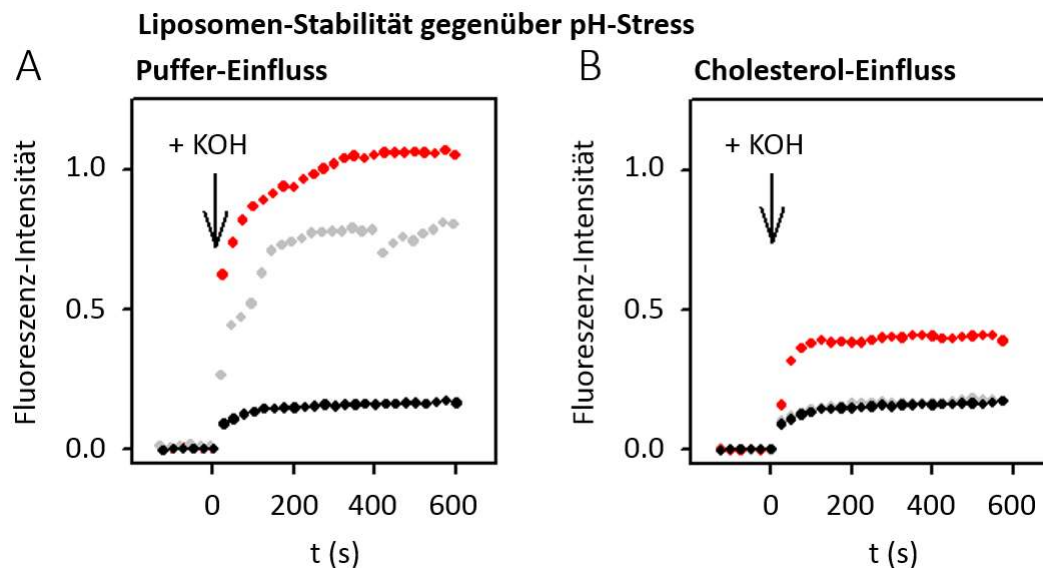


Abbildung 4.37: Fluoreszenzmessung von 500 μ l pyraninhaltigen Liposomen, die in verschiedenen Puffern oder mit verschiedenem Cholesterin-Gehalt bei pH 6,8 hergestellt wurden. Anregung bei 450 nm (deprotonierte Form), Emission bei 512 nm. Zugabe von 3,85 μ l isotoner 20 mM KOH bei $t = 0$. Liposomen (A) in 20 mM HEPES (rot, Liposomen-Puffer I), in 20 mM HEPES, 50 mM K_2SO_4 (grau) und in 200 mM Saccharose, 100 mM KCl, 5 mM MES, 5 mM HEPES (schwarz, Liposomen-Puffer II) hergestellt. (B) In Liposomen-Puffer II hergestellte Liposomen mit 0 % (schwarz) 33 % (grau) und 50 % (rot) Cholesterin-Gehalt (m/m).

In 20 mM HEPES (Liposomen-Puffer I) und 20 mM HEPES, 50 mM K_2SO_4 hergestellte Liposomen zeigen starke und lange andauernde Änderungen der Fluoreszenzintensität (Anstieg um 210 und 175 Einheiten nach 600 s). In 200 mM Saccharose, 100 mM KCl, 5 mM MES, 5 mM HEPES (Liposomen-Puffer II) hergestellte Liposomen zeigten schwache Änderung der Fluoreszenzintensität (Anstieg um 40 Einheiten nach 600 s). Letzte Bedingung wies also die geringste Permeabilität gegenüber Protonen und deren Gegenionen auf. Der Zusatz von 33 % Cholesterin führte zu keiner Änderung des Fluoreszenzverhaltens nach KOH-Zugabe. 50 % Cholesterin-Gehalt führte zu einem erhöhten Fluoreszenzsignal, also zu einer höheren Durchlässigkeit der Liposomenmembran gegenüber Protonen und deren Gegenionen. Als optimal erwies sich deshalb eine Liposomenherstellung mit 0 % Cholesterin in Liposomen-Puffer II, da bei diesen Bedingungen eine äußere pH-Wert Änderung den geringsten Einfluss auf das Fluoreszenz-Verhalten von Pyranin hatte (Abbildung 4.37). Deshalb wurden diese

Bedingungen für alle Liposomenpräparationen genutzt, die zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit entstanden.

4.6.4 Einfluss der Detergenzkonzentration auf die FNT-Rekonstitution

Um die Herstellung von Proteoliposomen mit zellfrei hergestellten Membranproteinen zu ermöglichen, ist es nötig, das Protein zunächst zu konzentrieren, um eine möglichst niedrige Detergenzkonzentration während des Herstellungsprozesses einzubringen. Zu Beginn der Arbeit wurde dafür das in unserem Arbeitskreis bereits zuvor für diesen Zweck genutzte, Amicon-*filter-device* mit 30 kDa cut-off genutzt. Dabei traten oftmals Probleme bei der Proteinrekonstitution und der generellen Liposomendichtigkeit auf. Bei Proteoliposomenchargen, deren Proteine mit 100 kDa-*cut off* statt 30 kDa-*cut-off* Amicon-*filter-devices* konzentriert wurden, besserte sich die Problematik. Dies konnte mittels der Dichtegradientenzentrifugation gezeigt werden. 100 kDa-*cut-off*-Proteoliposomen zeigten FNT-Proteinbanden bei 15-20 % Saccharose, was dem in Liposomen rekonstituierten Protein entspricht. 30 kDa-*cut-off*-Proteoliposomen zeigten eine zusätzliche FNT-Bande in der Spur mit 30 % Saccharose, welche nicht in Liposomen rekonstituiertes Protein darstellt (110). In Abbildung 4.38 sind beispielhaft die Dichtegradientenzentrifugations-Western Blots zweier Zubereitungen von *PfFNT*-Liposomen zu sehen, wobei verschiedene *cut-off*-Filter (30 kDa und 100 kDa) zum Einsatz kamen.

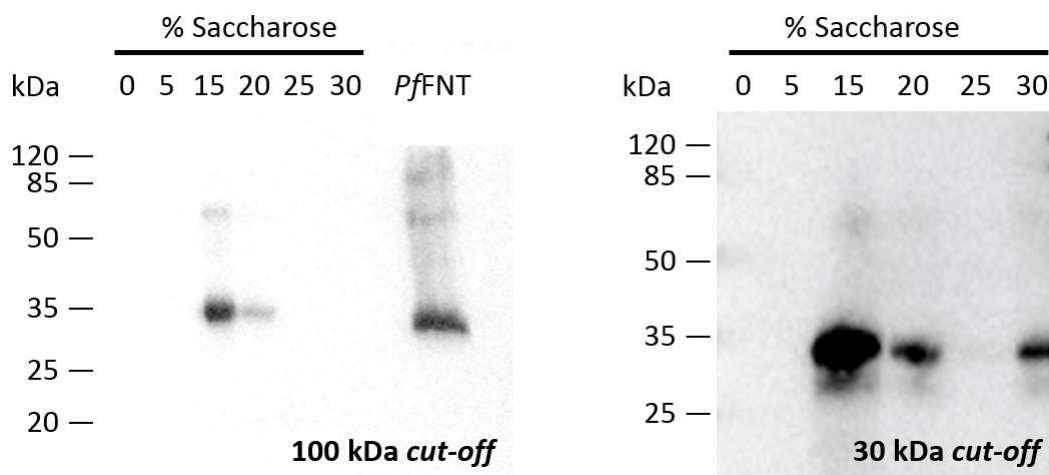


Abbildung 4.38: Dichtegradientenzentrifugation Western Blot Ergebnisse von *PfFNT*-Proteoliposomen ($MW_{PfFNT} = 35$ kDa, Anti-Penta-His 1 : 5000). (A) Während der Proteinherstellung mit 100 kDa *cut-off* wurde gesamtes Protein in den Liposomen enthaltenden Fraktionen 15-20 % Saccharose detektiert. (B) Unter Verwendung des 30 kDa *cut-off* Amicon *filter device* wurde nicht rekonstituiertes Protein in 30 % Saccharose-Fraktion beobachtet.

Aufgrund der Mizellgröße von Brij® 78 (67 kDa (125)) fand während der Proteinwahrscheinlich auch eine Detergenzkonzentrierung in den 30 kDa-*cut-off* Filtern statt, wodurch bei der Herstellung der Proteoliposomen die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) von Brij® 78 (0,005 %) nicht unterschritten wurde und weshalb nicht in Liposomen rekonstituiertes Protein in Detergenzmizellen zurückblieb. Nach dem Wechsel von 30 kDa zu 100 kDa *cut-off* Filtern konnte diese Problematik behoben werden, wie im Western Blot in Abbildung 4.38 erkennbar ist. Auch die Dichtigkeit der Leerliposomen gegenüber den Substraten wurde gesteigert. In Abbildung 4.39 sind dafür beispielhaft Streulichtmessungen von Leerliposomen gegen einen Acetat-Gradienten dargestellt. Die Liposomen wurden unter selben Bedingungen und mit selben Liposomen-Puffer II (200 mM Saccharose, 100 mM KCl, 5 mM HEPES, 5 mM MES pH 6,8), aber mit unterschiedlichen Amicon-*filter-devices* hergestellt.

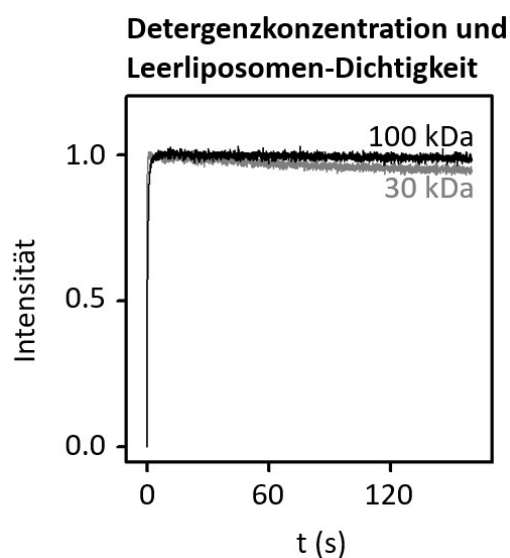


Abbildung 4.39: Streulichtmessung über 160 s von zwei Leerliposomenchargen. Einfluss des verwendeten Amicon-*filter-devices* bzw. der Detergenzien-Konzentration auf die Dichtigkeit von Leerliposomen gegenüber eines 200 mM Acetat-Gradienten bei pH 6,8. In Liposomen-Puffer II (200 mM Saccharose, 100 mM KCl, 5 mM HEPES, 5 mM MES pH 6,8) unter Nutzung von 100 kDa (schwarz) und 30 kDa (grau) Filter *cut-offs* hergestellt. Experiment wurde einmal durchgeführt.

Bei Langzeitmessungen fällt auf, dass die Leerliposomen, die mit 100 kDa *cut-off* Filter hergestellt wurden, weniger passiven Substrateinstrom zeigen, als solche die mit 30 kDa *cut-off* hergestellt wurden (Abbildung 4.39). Dies liegt wahrscheinlich an einer Brij® 78-Konzentrierung bei Nutzung der kleineren Filterporengröße, welches als amphiphiles Teilchen die Integrität der Liposomenmembran stört.

5 Diskussion

5.1 Methodenoptimierung

5.1.1 FNTs ohne zentrales Histidin sind in Hefezellen nicht funktionell

Es konnte keine Aufnahme von ^{14}C -markiertem Formiat durch *EhFNT* oder *BtFdhC1* in Hefezellen gezeigt werden, denen endogene Monocarboxylat-Transporter fehlten (W303-1A Δ jen1 Δ ady2 *S. cerevisiae*) (4.1). Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass Verkürzungen der Termini einen Einfluss auf die FNT-Funktionalität haben können (126, 127), doch auch eine Verkürzung des auffallend langen N-Terminus des *EhFNT* führte zu keiner messbaren Funktionalität im Hefe-Assay (4.1). Die Ursache für den fehlenden Funktionsnachweis im Hefezellversuch kann verschiedene Gründe haben. Trotz Kodonoptimierung der eingebrachten DNA produzieren die Hefezellen viele Proteinfragmente des *EhFNT*-Proteins und seiner verkürzten Version *EhFNT* Δ 1-90. *BtFdhC1* wird hingegen nur in sehr geringem Umfang hergestellt (4.1). Ob korrekt hergestellte FNTs überhaupt im signifikanten Maße an die äußere Zellmembran gelangen, ist zudem unklar, könnte aber durch Isolierung der äußeren *S. cerevisiae*-Membran oder mikroskopische Methoden genauer analysiert werden. Da der Wechsel in das CECF-System gut erkennbare FNT-Multimere (4.2.4, 4.2.6) lieferte und auch die Funktion mit der *stopped-flow*-Methode gezeigt werden konnte (4.4.4.2), scheint die Problematik durch Störungen in der Proteinbiosynthese oder beim Proteintransport in die äußere Zellmembran der Hefezellen verursacht zu werden.

5.1.2 *EhFNT*-Proteingröße und Multimer-Stabilität

Eine Auffälligkeit der SDS-PAGE-Gele der FNTs besteht darin, dass die Laufhöhe aller hergestellten FNTs im SDS-Gel unter dem theoretischen Molekulargewicht liegt (Tabelle 4.1) mit Ausnahme von *EhFNT* (Tabelle 4.1), welches im Blot bei höheren Größen läuft. Dies betrifft sowohl das zellulär- als auch das zellfrei hergestellte *EhFNT* (Kapitel 4.1 und 4.2.4). Bei der Proteingrößenbestimmung mit der Lumi Imager[®] Software weist das *EhFNT*-Protomer im SDS-PAGE-Gel eine Masse von 48 kDa auf, ist mit anhängenden *tags* rechnerisch aber nur 44 kDa schwer. Die im Detergenzien-*Screening* genutzte N-terminal verkürzte Version *EhFNT* Δ 1-90-GFP läuft mit 48 kDa bei geringerer Masse als zuvor errechnet (56 kDa) und zeigt demnach ein für FNTs gewöhnliches Laufverhalten in der SDS-PAGE-Analyse (4.2.3). Dies legt nahe, dass der lange N-Terminus des unverkürzten *EhFNT* dazu führt, dass *EhFNT* ein erhöhtes Volumen im Polyacrylamid-Gel einnimmt und daher bei einer höheren Masse läuft als errechnet. Möglicherweise erklärt dies ebenfalls die Differenz zwischen der aus dem 3D-Modell errechneten Pentamergröße von 8,37 nm (Abbildung 4.10) und der in der TEM gemessenen Pentamergröße von 10,87 nm \pm 0,06 nm (4.2.6) von *EhFNT* in Mizellen.

Die in Brij® 78-Mizellen eingelagerten FNT-Multimere scheinen interessanterweise gegenüber dem harschen Detergens Natriumlaurylsulfat (SDS) stabil zu sein (4.2.4). Dies wurde bereits schon zuvor für zellfrei und zellulär hergestellte FNTs (40, 15) beobachtet. Die hohe Stabilität der Multimere lässt sich vorwiegend auf besonders starke lipophile Wechselwirkungen an den Kontaktstellen der einzelnen Protomere zurückführen (Abbildung 5.1).

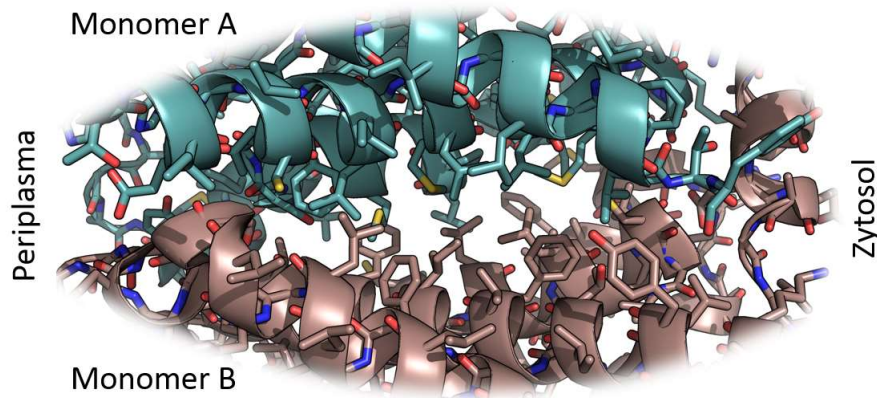


Abbildung 5.1: Kontaktstelle zweier FocA-Protomere (A-Kette (türkis) und B-Kette (bronzen) aus PDB #3Q7K. Heteroatome sind farblich markiert (rot = Sauerstoff, blau = Stickstoff, gelb = Schwefel), Kohlen- und Wasserstoff sind in den Farben der jeweiligen Kette dargestellt. Gut erkennbar ist, dass sich kaum polare Aminosäureseitenketten mit Heteroatomen, aber viele mit unpolaren Kohlenwasserstoffketten an der Kontaktstelle befinden.

Da sich *EhFNT*- und *PfFNT*-Pentamere in Detergenzmizellen nachweisen lassen, ist anzunehmen, dass diese erst unter der für die SDS-PAGE nötige Behandlung zu Mono- und Multimeren zerfallen.

5.1.3 Optimierung der Proteoliposomenherstellung

Während der Arbeiten wurden verschiedene Schwachstellen des Proteoliposomen-Systems festgestellt. Ein generelles Problem bei der Proteoliposomenherstellung bestand in der Dichtigkeit der Membran gegenüber Protonen und deren Gegenionen. Durch Versuche an pyraninbeladenen Leerliposomen konnte die Membrandichtigkeit untersucht werden (4.6.3). Dabei wurde durch geeignete Pufferbedingungen die Liposomendurchlässigkeit minimiert. Ein Cholesterol-Zusatz zeigte keine stabilisierende Wirkung auf die Liposomenmembranen. Der in normierten Streulicht-Kurven beobachtete, schnellere initiale Wasserausstrom von FNT-Proteoliposomen gegenüber Leerliposomen konnte durch Anpassung des Puffer-Systems minimiert werden (4.6.2). Zudem konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von DMSO im Liposomen-System zu einer starken Durchlässigkeit für Substrate führt, was den Einsatz des in unserem Arbeitskreis entdeckten FNT-Inhibitors MMV007398 (20, 21) verhinderte (4.6.1). Es konnte außerdem beobachtet werden, dass die Wahl des Amicon-filter devices zur Proteinkonzentrierung entscheidend für die Proteinrekonstitution in Liposomen und die Dichtigkeit von Liposomen ist (4.6.4), was vermutlich auf eine Konzentration von Detergens bei Gebrauch von *cut-off*-Größen unter 100 kDa zurückzuführen ist. Diese Annahme gründet

auf der Tatsache, dass das für die zellfreie Herstellung von *EhfFNT* (MW = 40 kDa) und *PfFNT* (MW = 35 kDa) genutzte Brij® 78 oberhalb seiner CMC in wässrigen Lösungen Mizellen mit einer Größe von ca. 67 kDa bildet (125). Detergenzmizellen mit und ohne Protein wurden vermutlich während der Proteinreinigung von dem 30 kDa *cut-off* zurückgehalten und konzentriert.

5.1.4 Vergleichbarkeit der ermittelten Daten mit anderen Systemen

Bisher ermittelte Werte der FNT-vermittelten Substrattransports liegen oft als Raten (s^{-1} in Liposomen-System oder $mmol^{-1} mg^{-1} min^{-1}$ im Hefe-System) vor. Die Ermittlung der Steigerung der Substratpermeabilität der FNT-Proteoliposomen gegenüber Leerliposomen bietet eine Möglichkeit, die FNT-vermittelte Transportsteigerung quantitativ zu erfassen und somit eine systemübergreifende Vergleichbarkeit zu schaffen. Die Permeabilität bzw. der Permeabilitätskoeffizient P_{sol} gibt an, mit welcher Geschwindigkeit sich Teilchen über die Liposomenmembran bewegen. Sie kann näherungsweise mit folgender Formel beschrieben errechnet werden (128, 129).

$$P_{sol} = \frac{K V_0 c_{au\beta en}}{A_0 \Delta c}$$

Dafür müssen die initiale Transportrate K , die initiale durchschnittliche Liposomengröße V_0 und -oberfläche A_0 , die Gesamtkonzentration der gelösten Moleküle im äußeren Medium $c_{au\beta en}$ und der chemische Substratgradient $\Delta c (= c_{out} - c_{in})$ bekannt sein. Die Formel lässt sich weiter abkürzen durch Einsetzen der Formeln der Geometrie für Kugeloberfläche und -volumen unter der Annahme, dass es sich um kugelförmige Liposomen handelt (99):

$$P_{sol} = \frac{K r c_{au\beta en}}{3 \Delta c}$$

Da $c_{au\beta en}$ und Δc bekannt waren und r und K während der Arbeit ermittelt wurden, ließ sich P_{sol} daraus ableiten. Für Messungen mit Liposomen-Puffer I und Gradienten-Lösung I ergab sich bei pH 6,8 ein $c_{au\beta en}$ von 60 mM und Δc von 20 mM in der Mischkammer. Der Radius der in dieser Arbeit hergestellten Liposomen in Liposomen-Puffer I betrug laut Messungen 75 nm (Kapitel 4.3.1). Diese Werte waren für Messungen innerhalb dieses Systems konstant, wodurch der Term durch Bildung einer Konstante vereinfacht wurde zu:

$$P_{sol} = K K_L,$$

$$\text{mit } K_L = \frac{r c_{au\beta en}}{3 \Delta c} = 7,5 \cdot 10^{-8} \text{ m}$$

K_L lässt sich bei konstanten Messbedingungen demnach durch Einsetzen vom Radius r von $7,5 \cdot 10^{-8} \text{ m}$, ein $c_{au\beta en}$ von 60 mM und Δc von 20 mM zu $7,5 \cdot 10^{-8} \text{ m}$ zusammenfassen. Für

eine Initiale Transportrate K von $0,00465 \text{ s}^{-1}$ (BtFdhC1 Formiat-Aufnahme, Tabelle 4.2) ergibt sich also eine Permeabilität P_{sol} von $7,5 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot 0,00465 \text{ s}^{-1} = 3,5 \cdot 10^{-10} \text{ m s}^{-1}$ bzw. $0,35 \text{ nm s}^{-1}$. Unter den Messbedingungen konnte kein passiver Einstrom von Formiat in Leerliposomen gemessen werden, warum der Permeabilitätskoeffizient hier gegen null geht und davon auszugehen ist, dass der Anteil der passiven Membrandiffusion von Protonierter Ameisensäure vernachlässigbar gering ist.

Geht man davon aus, dass der Porendurchmesser der Extrusionsmembran ($0,2 \mu\text{m}$) die Größe der Liposomen definiert und damit immer Liposomen von 150 nm Durchmesser entstehen, so lassen sich die Permeabilitätskoeffizienten für Liposomen, die im Liposomen-Puffer II hergestellt wurden, ermitteln. Dabei erhält man nach Einsetzen der Werte von Radius r von $7,5 \cdot 10^{-8} \text{ m}$, $c_{au\beta en}$ von 810 mM und Δc von 400 mM in obige Formel für K_L einen Wert von $5,1 \cdot 10^{-8} \text{ m}$.

Unter Berücksichtigung der in 4.4.4.2 ermittelten initialen Transportraten erhält man die Permeabilitäten von Formiat in EhFNT-Liposomen bei verschiedenen pH-Werten wie in Tabelle 5.1 dargestellt.

Tabelle 5.1: Permeabilität von EhFNT-Liposomen für Formiat bei verschiedenen pH-Gradienten und das Verhältnis von Ameisensäure zu Formiat im äußeren Kompartiment (HA / A⁻).

pH _{innen}	pH _{außen}	Kapazität [%]	Initiale Rate [s ⁻¹ 1000 ⁻¹]	Permeabilität [m s ⁻¹ 10 ⁻¹⁰]	Verhältnis HA / A ⁻ außen
6,8	4,8	16,1 ± 3,7	9,1 ± 2,6	4,6 ± 1,3	1 zu 11
6,8	6,8	6,6 ± 1,6	3,8 ± 1,4	1,9 ± 0,7	1 zu 1072
6,8	7,8	0,0 ± 0,7	0,1 ± 0,1	0,05 ± 0,05	1 zu 10715
4,8	2,8	19,8 ± 0,8	22,2 ± 0,8	11,3 ± 0,4	9 zu 1
4,8	4,8	10,3 ± 2,7	6,9 ± 4,2	3,5 ± 2,1	1 zu 11

Um die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Systemen zu ermöglichen, kann zudem ausgehend von der Permeabilität von FNTs im Sättigungsbereich der Flux J durch einen einzelnen FNT ermittelt werden. Dieser gibt die Anzahl an transportierten Molekülen pro Zeiteinheit und FNT an (130). Er berechnet sich aus der Permeabilität im Sättigungsbereich P_{fS} , der durchschnittlichen Oberfläche eines Proteoliposoms A_v , der Anzahl an FNTs pro Liposom N_{FNT} und dem Konzentrationsgefälle zu Versuchsbeginn zwischen Liposomeninneren und äußerem Kompartiment Δc .

$$J = \frac{P_{fS} \Delta c A_v}{N_{FNT}}$$

Die Ermittlung des Flux J ist ein wichtiger Schritt, um molekulardynamische Simulationen hinsichtlich ihrer Plausibilität zu prüfen und die Direktionalität von FNTs zu untersuchen. Dafür muss die benötigte Permeabilität im Sättigungsbereich P_{fS} durch Erhöhung des initialen

Konzentrationsgefälles Δc im Streulichtversuch ermittelt und die durchschnittliche Proteoliposomenoberfläche A_p durch Analyse des hydrodynamischen Durchmessers mit Hilfe des Zetasizers wie gezeigt errechnet werden (4.3.1). Die Bestimmung der durchschnittlichen Anzahl an FNTs kann mit der *freeze-fracture*-Elektronenmikroskopie erfolgen (131).

5.1.5 Einfluss des chemischen Gradienten auf normierte Streulichtkurven

Die Normierung der Liposomen wird durch Verschiebung des initialen Streulichtsignals auf einen Wert von 0,0 bei $t = 0$ und die Multiplikation des maximalen Signals mit einem Faktor ermöglicht, so dass das Maximum bei 1,0 liegt. Problematisch ist dabei folgender Punkt:

Leerliposomen ziehen sich zu einem minimalen Volumen zusammen. Durch die Normierung der FNT-Liposomen auf ein identisches Maximum wird suggeriert, dass auch diese sich auf die gleiche Größe zusammenziehen. Dies ist aber nicht der Fall, da hier der Ausgleich des osmotischen Schocks neben schnellem Wasseraustritt auch durch die langsamere Substrataufnahme bedingt wird. Benutzt man einen niedrigen Substratgradienten (20 mM) in einem System mit niedriger Osmolarität (20 mOsmol bei 20 mM HEPES Puffer), wie dies zu Beginn der Arbeit der Fall war, so ist dieser Effekt gravierend (4.6.2). Die normierten Kurven suggerieren einen stärkeren Wassereinstrom für FNT-Liposomen. Dieser Effekt wird durch einen Wechsel zu einem stärkeren osmotischen Gradienten nahezu nivelliert (4.6.2). Eine Alternative dazu wäre die Arbeit bei isoosmotischen Startbedingungen mit dem Nachteil, dass in diesem Versuchsaufbau der Substrateinstrom zu einem Schwellen der Liposomen führt, welches durch die Spannung der Lipidmembran kontrolliert wird oder zum Zerreißen der Liposomen führt.

Ein weiterer Nutzen eines starken chemischen Gradienten von ca. 200 mM besteht darin, dass das Signal-Rauschverhältnis gesteigert wird und der beim niedrigeren 15 mM Gradienten beobachtete passive Transport in Leerliposomen unter die Detektionsgrenze fällt (4.4.3).

5.2 Klärung des Funktionsmechanismus von FNTs

5.2.1 Transport der FNTs ohne zentrales Histidin ist protonengradientenabhängig

Die beiden FNTs *EhFNT* und *BtFdhC1* transportieren Monocarboxylate (4.4.1, 4.4.2), obwohl sie im Gegensatz zu allen bisher untersuchten FNTs an der zentralen Stelle des Transportpfades kein Histidin mit protonierbarer Seitenkette, sondern mit Asparagin (*EhFNT*) und Glutamin (*BtFdhC1*) nicht protonierbare Aminosäureseitenketten aufweisen (0). Dies widerlegt die von Lü *et al.* und Hub *et al.* postulierten FNT-Funktionsmodelle, weil beide dem zentralen Histidin die Rolle der Protonenübertragung auf das Substratanion zuschreiben, ohne die der hauptsächliche Substrattransport nicht erklärbar ist (1.1.4.1).

Da beide untersuchten FNTs ohne zentrales Histidin sowohl auf der extra- als auch der intrazellulären Seite des Transportpfades konservierte Lysine enthalten (0), ist ihre Funktion mit dem *dielectric-slide*-Mechanismus erklärbar (1.1.4.2). Die positiv geladenen Lysine führen

zur Anziehung des Substrates in das lipophile Vestibül und damit zur Übertragung eines Protons vom Bulkwasser auf das Substratmolekül (1.1.4.2).

Durch die Erhöhung des Protonen- bei gleichbleibenden Substratgradienten konnte im Hefe-System ein glockenförmiger Kurvenverlauf der pH-abhängigen Substrataufnahme an konventionellen FNTs mit zentralem Histidin beobachtet werden (3, 15) (1.1.4.2). Die maximale Transportrate wurde bei einem äußeren pH-Wert erreicht, der ungefähr dem pK_S -Wert des Substrates entsprach, also im leicht Saurem (pH 3,8 – 4,8) liegt. Der erhöhte Transport bei höherer Protonenkonzentration lässt sich im *dielectric-slide*-Mechanismus durch eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Protonenübertragung vom Bulk-Wasser auf das Substratmolekül im Transportpfad erklären (39). Bei weiterer Senkung des äußeren pH-Wertes unter den pK_S -Wert des Substrates fiel die Transportrate wieder ab, was dadurch erklärt wird, dass die ungeladenen Säuremoleküle nicht vom Lysin angezogen und in den Transportpfad geleitet werden können (3). Auch im Liposomen-System ließ sich im Zuge dieser Arbeit sowohl für die konservativen FNTs am Beispiel von *PfFNT* als auch für *EhFNT* als Vertreter der FNTs ohne zentrales Histidin dieses vom Protonengradienten abhängige Verhalten nachweisen. Dabei wurde der abfallende Teil der glockenförmigen Kurve vom Protonengradienten abhängigen Substrattransport vom leicht saurem (pH \geq 4,8) zum basischen pH-Wert erfasst (4.4.4.2). Bei Änderung der Herstellungs- und Messbedingungen von *EhFNT*-Liposomen durch eine pH-Wert-Senkung um zwei Einheiten konnte beobachtet werden, dass das vom Protonengradienten abhängige Transportverhalten nicht auf den Protonierungszustand von FNT-Proteinen, Phospholipiden oder Substrat zurückzuführen ist (4.4.4.2).

5.2.2 Transportkapazität von *EhFNT*-Liposomen ist protonengradientenabhängig

Die Gesamttransportkapazität der *EhFNT*-Liposomen wurde durch Erhöhung des Substratgradienten nicht gesteigert (4.4.3). Es gibt hierfür also einen anderen limitierenden Faktor. Da FNTs einen Proton-Substrat-Symport vermitteln, bildet sich ein Protonengradient aus, wenn bei initial gleichem äußeren und innerem pH-Wert Substrate entlang eines chemischen Gradienten in FNT-Liposomen transportiert werden. Da dieser dem chemischen Gradienten entgegen gerichtet ist, stellt sich ein Gleichgewicht ein, das die insgesamt aufgenommene Menge an Substrat limitiert. Die Steigerung des Substratgradienten kann lediglich die Geschwindigkeit zur Gleichgewichtseinstellung (initiale Transportrate) nicht aber die insgesamt aufgenommene Substratmenge (Transportkapazität) erhöhen.

Sowohl für *EhFNT* als auch für die Positivkontrolle *PfFNT* wurde mit zunehmenden Protonengradienten von außen nach innen ein Anstieg des Transportes in die Liposomen beobachtet, der neben einer erhöhten initialen Transportrate auch zu einer Steigerung der Transportkapazität führte (4.4.4.2). Am Beispiel von *EhFNT* konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt nur vom Protonengradienten und nicht vom Protonierungszustand von FNTs, Phospholipiden oder Substraten abhängig ist. Die gesteigerte Transportkapazität lässt sich darauf zurückführen, dass bei gleichgerichteten Substrat- und Protonengradienten mehr

Substrat transportiert werden kann. Erst nach einer größeren transportierten Substratmenge wird ein dem Substratgradienten entgegengerichteter Protonengradient erzeugt, der den Substrattransport zum Erliegen bringt. Wenn der Protonengradient bereits initial dem Substratgradienten entgegengerichtet war, ließ sich daher kein Transport zeigen (4.4.4.2).

Die Betrachtung der Beeinflussung der Transportkapazitäten durch Substrat- oder Protonengradienten ist ein Beleg dafür, dass der Transport durch FNTs ohne zentrales Histidin durch einen Protonengradienten gesteuert wird. Der von Lü *et al.* beobachtete Anionentransport im Neutralen bis Basischen spielt demnach eine untergeordnete Rolle bei ihrer Funktionsweise, da beim elektrogenen Transport ein Membranpotential erzeugt wird, das den weiteren Transport zum Erliegen bringt. Der elektroneutrale Proton-Anion-Symport hingegen führt zu keinem Membranpotential. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Beobachtungen von Wiechert *et al.* (3) und ist ein Indiz dafür, dass der *dielectric-slide*-Mechanismus die Funktion von FNTs korrekt beschreibt.

5.2.3 Unterschiedliche Substratselektivität aufgrund des ϕ /K-Selektivitätsfilters

Den erstellten dreidimensionalen Modellen von *EhFNT* und *BtFdhC1* zufolge verfügen beide FNTs über eine FNT-typische Selektivitätsfilterregion auf der zytoplasmatischen Seite (16), deren Größe sich voneinander unterscheidet und die das Substratspektrum maßgeblich beeinflusst (0 und 4.4.2). Das prokaryotische *BtFdhC1* weist dabei einen schmalen Selektivitätsfilter durch voluminöse Seitenketten auf. Dies ist typisch für prokaryotische FNTs, welche an dieser Stelle meist die Aminosäuren Valin und Phenylalanin aufweisen. *BtFdhC1* ist aufgrund des schmalen Selektivitätsfilters in der Lage, Formiat und Acetat, nicht aber L-Laktat zu transportieren. Das eukaryotische *EhFNT* besitzt aufgrund weniger voluminöser Aminosäuren im Selektivitätsfilter wie Glycin und Alanin einen größeren Selektivitätsfilter und kann alle drei Substrate transportieren. Auch das Substratspektrum der Positivkontrollen *EcFocA* von *PfFNT* stimmt mit den Ergebnissen des zellulären Systems überein (4.4.2) (3).

Die beiden untersuchten FNTs ohne zentrales Histidin waren zudem in der Lage, Propionat zu transportieren (4.4.2). Dieses Molekül besitzt im Gegensatz zu L-Laktat keine Hydroxylgruppe in 2-Position und kann durch seine lineare Struktur ähnlich wie Formiat und Acetat auch durch schmalere prokaryotische FNTs transportiert werden. Ob das Substratspektrum der durch FNTs transportierten Fettsäuren auch längere Substrate wie Butyrat umfasst, müssen spätere Untersuchungen zeigen. Das Dicarboxylat Malonat wurde wie erwartet nicht von FNTs transportiert (4.4.2).

Die physiologische Transportfunktion von *BtFdhC1* ist demnach auf den Transport kleinerer Monocarboxylate beschränkt, wie zuvor aufgrund der Genlokation anzunehmen war (1.1.7). Die Transportfähigkeit von L-Laktat könnte bei invasiver Amöbiasis in glukosearmen Geweben relevant sein, L-Laktat stellt jedoch kein Endmetabolit von *E. histolytica* dar. Propionat hingegen stellt bei nicht invasiver Amöbiasis eine reichlich vorhandene Kohlenstoffquelle im glukosearmen Darm-Lumen dar. Die Aufnahme von Propionat über *EhFNT* könnte daher von Bedeutung für das Überleben von *E. histolytica* im Kolon sein (5.3.1).

5.2.4 FNTs ohne zentrales Histidin zeigen niedrige, FNT-typische Substrataffinität

Für FNTs ohne zentrales Histidin konnte anhand von *EhFNT* gezeigt werden, dass sie über eine niedrige Substrataffinität verfügen (4.4.3). Auch bei einem 200 mM Acetat-Gradienten war die Sättigung des Transportes noch nicht erreicht. Diese niedrige Affinität ist für die FNTs wichtig, da sie sonst durch störende Substratanaloga wie Chloridionen inhibiert werden würden. Außerdem würde aufgrund einer erhöhten Substrataffinität die Freigabe von Substraten aus der Transportpore und damit die Transportrate gesenkt werden. Eine niedrige Affinität ist typisch für die kanalartigen Eigenschaften der FNTs (3). Da während der Versuchsdurchführungen dieser Arbeit die Sättigung von *EhFNT* nicht erreicht wurde, war eine Darstellung im Lineweaver-Burk-Diagramm und die Bestimmung eines K_M -Wertes nicht möglich (4.4.3).

5.2.5 Funktion der polaren Aminosäuren im Transportpfad von FNTs

Die zentrale Stelle des Transportpfades von FNTs stellt eine Besonderheit dar, da sich an dieser Stelle die einzige hydrophile Aminosäureseitenkette in der ansonsten von lipophilen Seitenketten geprägten Kavität befindet (1.1.2 und 0). In konventionellen FNTs konnte das zentrale Histidin nicht mutiert werden, ohne dass die Funktionalität verloren geht (3, 35, 1), weshalb Lü *et al.* vermuteten, die Imidazol-Seitenkette sei für den Protonierungsschritt verantwortlich. Die Mutation des zentralen Asparagins zu einem Histidin in der *EhFNT_N283H* Mutante erwies sich als nicht funktionell (4.4.4.1). Da bereits zuvor gezeigt wurde, dass die Mutation eines klassischen FNTs an der zentralen Position von Histidin zu Asparagin (*EcFocA_H209N*) ebenfalls zu einem Funktionsverlust führt, scheint diese Stelle sehr sensibel gegenüber Mutationen zu sein (39). Der Funktionsverlust ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass sich durch die bei der Mutation eingefügten Aminosäuren die dreidimensionale Struktur im Porenbereich änderte, was möglicherweise zu einem Verschluss der Pore führte. Da sich die *EhFNT_N283H* Mutante im Western Blot als Multimer nachweisen ließ (4.2.4) und dabei auf der zu erwartenden Höhe läuft, ist anzunehmen, dass die Tertiär- und Quartärstruktur auf Makroebene nicht gestört wurde.

Doch warum tragen alle FNTs an dieser Stelle eine Aminosäure, deren Seitenkette Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann?

Offensichtlich haben diese Aminosäuren eine wichtige strukturgebende Funktion für die Transportpore der FNTs. Die Reste der zentralen Aminosäuren Asparagin in *EhFNT* und Glutamin in *BtFdhC1* sind mit $127,5 \text{ \AA}^3$ und $149,4 \text{ \AA}^3$ (132) etwas kleiner als das $159,3 \text{ \AA}^3$ große Histidin in konventionellen FNTs, was erklärt, dass dieser Aminosäureaustausch sterisch toleriert wird. Der Funktionsverlust nach Mutation der zentralen Aminosäure zum $193,5 \text{ \AA}^3$ großen Phenylalanin könnte zu einer Konformationsänderung im Transportpfad geführt haben, die möglicherweise den Transport verhinderte (35). Darüber hinaus müssen auch die physikochemischen Eigenschaften der Aminosäuren betrachtet werden. Die Imidazolgruppe der Histidinseitenkette kann als Wasserstoffbrückenakzeptor und -donator fungieren. Es

bildet eine Wasserstoffbrücke zu einem fixierten Wassermolekül aus (Abbildung 1.10). Die aromatische Phenylseitenkette des Phenylalanins ist dazu nicht in der Lage, warum die Mutation des Histidins zum Phenylalanin möglicherweise zu einem Verlust des Wassermoleküls führt. Das wiederum führt wahrscheinlich zum Kollabieren der entstehenden Lücke im FNT, was die Struktur des Transportpfades stark beeinflussen würde. Aminosäuren mit Amidfunktionen in der Seitenkette wie Asparagin und Glutamin hingegen sind in der Lage das Wasser über Wasserstoffbrücken zu fixieren und funktionelle Transportpfade zu bilden (Abbildung 1.10). Es ist darüber hinaus denkbar, dass polare Aminosäureseitenketten nicht nur für die Struktur, sondern auch für den Transportmechanismus von Bedeutung sind. Möglicherweise werden die protonierten Säuremoleküle über Wasserstoffbrückenbindungen kurzzeitig in der lipophilen Kavität stabilisiert und die energetische Barriere für den Stofftransport durch die Wechselwirkungen gesenkt (2). In der Kristallstruktur PDB #3Q7K von FocA befinden sich Formiatmoleküle vor allem im Poreneingangsbereich. Dort befinden sie sich in direkter Nachbarschaft zum Lysin K156, das laut dem *dielectric-slide*-Mechanismus in protonierter Form das Säure-Anion anzieht. Wenn das zentrale Histidin protoniert neben dem Säure-Anion in der Kavität vorläge (2, 37), sollte vor dem Protonierungsschritt die Wechselwirkung zwischen beiden Strukturen sehr stark sein (2), was den Transport behindern würde. Die Tatsache, dass kein Formiat-Molekül innerhalb der Kavität in der Kristallstruktur beobachtet wurde, weist darauf hin, dass keine Wechselwirkung zwischen protoniertem Histidin und Formiat stattfand. Aus energetischen Gründen wäre eine protonierte Aminosäure in der lipophilen Kavität ungünstig und daher auch unwahrscheinlich. Der Protonierungszustand des zentralen Histidins konservativer FNTs ist Gegenstand aktueller Forschung unserer Gruppe.

5.2.6 Nachweis von Proton-Substrat-Symport durch FNTs mit Fluorophoren

Der Versuch den Proton-Substrat-Symport durch pyraninbeladene *Pf*FNT- und *Eh*FNT-Liposomen nachzuweisen, gelang aufgrund der fehlenden FNT-Transportfunktion nicht (4.4.4.3). Da sowohl in Streulicht- als auch in Fluoreszenzmessungen kein Unterschied zwischen dem Signal der Leerliposomen und der FNT-Liposomen beobachtet wurde, ist davon auszugehen, dass Pyranin den FNT-vermittelten Transport im Liposomen-System stört. Im Hefezell-Versuch konnte keine Beeinflussung der *Pf*FNT-Transportfähigkeit beobachtet werden. Der Grund für den Transportverlust der FNTs bei Pyranin-Beladung der Liposomen konnte nicht ermittelt werden. Versuche an pyraninbeladenen Leerliposomen verliefen dagegen entsprechend den Angaben in der Literatur und konnten zur Untersuchung der Liposomendichtigkeit genutzt werden (4.6.3).

ACMA-beladene FNT- und Leerliposomen zeigten in zeitabhängigen Fluoreszenzanalysen unterschiedliche Kurvenverläufe nach Zugabe eines Substratgradienten (4.4.4.3). Der dabei gemessene Anstieg der Fluoreszenzsignale von ACMA-beladenen FNT-Proteoliposomen während des Monocarboxylat-Transports zeigt das *dequenching* von ACMA an. Dies entspricht gemäß der Interpretation nach Literaturangaben einer Zunahme des von außen nach innen gerichteten Protonengradienten (3.4.3.4). Während des Substrattransports durch FNTs in

Liposomen wurden demzufolge Protonen in die entgegengesetzte Richtung vom inneren ins äußere Kompartiment transportiert. Dieser beobachtete Proton-Substrat-Antiport ist unerwartet und widerspricht den anderen, in dieser Arbeit erhobenen Daten (4.4.4.2). Ein Proton-Substrat-Antiport wurde zuvor für FNTs nur einmal beschrieben (14). Bei den Untersuchungen von Rycovska *et al.* wurde ein Proton-Substrat-Antiport gemessen, wobei hier das pH-sensitive Fluorophor Acridinorange (3,6-Bis(dimethylamino)acridin) genutzt wurde, das in seinen Eigenschaften und Anwendungen dem in dieser Arbeit eingesetzten Acridin ACMA stark ähnelt (133) (Abbildung 5.2).

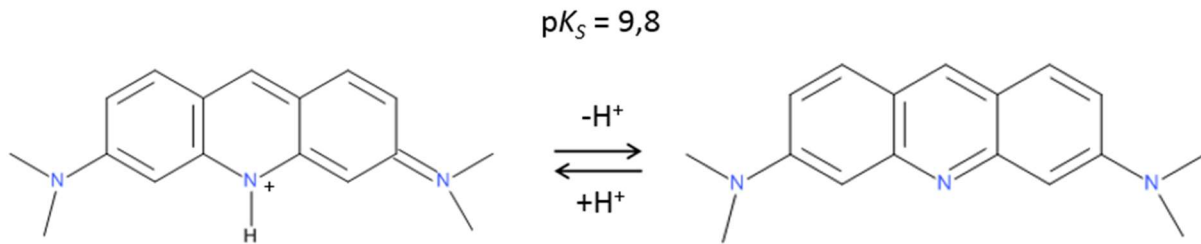


Abbildung 5.2: Acridinorange in protonierter und deprotonierter Form. Das pH-sensitive Fluorophor ist in ungeladener Form membrangängig. Abbildung mit Accelrys Draw 4.2 erstellt.

Die Einordnung der mit ACMA-beladenen Liposomen erzeugten Daten ist schwierig. Bisher wurde kein Symport von Protonen zusammen mit osmotisch aktiven Teilchen in ACMA-versetzte Liposomen untersucht, sondern der Austausch von Protonen gegen osmotisch aktive Kationen betrachtet (108, 101, 109, 105, 102) (3.4.2.3). Dabei wurde der Ausstrom der osmotisch aktiven Gegenionen genutzt, um die Entstehung eines Membranpotentials zu vermeiden, wobei es zu einem Wasserausstrom bzw. Schrumpfen der Liposomen kam. Im Falle des in dieser Arbeit beobachteten elektroneutralen Proton-Substrat-Symports kommt es dagegen zu einem Anstieg der Osmolarität im Liposomeninneren gegenüber dem umgebenden Medium. Dadurch kommt es zu einem Wassereinstrom bzw. Anschwellen der Liposomen über die Zeit, wie im Streulichtversuch gezeigt wurde (4.4.1).

Der Anstieg der Fluoreszenzkurven durch das Dequenching von ACMA lässt sich daher möglicherweise auch alternativ zu einem Proton-Substrat-Antiport durch FNTs erklären. Durch den zusätzlichen Transport von osmotisch aktivem Monocarboxylat wird das Gesamtvolumen in Liposomen erhöht und es kommt möglicherweise zum Dequenching des AMCA. Ein Grund dafür könnte darin liegen, dass das Gleichgewicht von an Membran gebundenen Molekülen und ungebundenen, anregbaren Molekülen im Liposomeninneren aufgrund der Volumenzunahme zugunsten der ungebundenen Moleküle verschoben wird (134, 100). Außerdem könnte das Monocarboxylat die Wechselwirkung zwischen negativ geladener Liposomenoberfläche und an die Membran gebundenen protonierten ACMA-Molekülen stören, diese von der Membran freisetzen und somit der Anregung zugänglich machen. Beide Effekte zusammen könnten mögliche Faktoren sein, die einen größeren Gesamteinfluss auf

das Dequenching von ACMA haben als der eigentlich zu untersuchende Protonentransport. Der dargestellte Kurvenverlauf entspräche demzufolge einer anderen Möglichkeit der Untersuchung der Schwellung der Liposomen aufgrund osmotischer Effekte und wäre dadurch nicht geeignet, um einen Proton-Substrat-Symport zu belegen. Da dieser bisher noch nicht beschriebene Effekt von ACMA-Dequenching durch Anschwellen der Liposomen bei allen drei untersuchten FNTs reproduzierbar war (4.4.4.3), könnte eine genauere Untersuchung der zugrunde liegenden Effekte für spätere biophysikalische Untersuchungen von ACMA-beladenen Proteoliposomen und der Reinterpretation bereits erhobener Daten, die mit Acridinen in Liposomen erzeugt wurden, von Bedeutung sein (14). Der Vergleich der ermittelten Raten aus Fluoreszenz- und Streulichtmessungen (4.4.1 und 4.4.2) legt nahe, dass die im ACMA-Versuch erhaltenen Kurven möglicherweise die osmotischen Prozesse während des Transports abbilden. Die ermittelten initialen Transportraten von *EhFNT*-, *PfFNT*- und *EcFocA*-Proteoliposomen aus dem ACMA-Versuch (4.4.4.3) sind 4-, 5- und 0,5-mal so hoch wie die aus den Streulichtversuchen (4.4.1), liegen also in vergleichbaren Dimensionen.

Der direkte Nachweis des Proton-Substrat-Symports durch FNTs im Liposomen-System konnte unter Einsatz der verwendeten Fluorophore ACMA und Pyranin nicht erbracht werden. Eine Alternative zu ACMA könnte das membrangebundene Oregon Green 488 (1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethano-lamine) darstellen (102). Auch eine Beladung der Liposomen mit Calcein (7-Bis((*N,N*-bis(carboxymethyl)amino)methyl)fluorescein) an Stelle von Pyranin könnte den erfolgreichen direkten Nachweis des Proton-Substrat-Symports in FNT-Liposomen ermöglichen (135).

5.2.7 *PfFNT* transportiert bidirektional und pH-abhängig

FNTs nehmen in ihrer physiologischen Funktion je nach Metabolismus eine Import- oder Export-Funktion ein (1, 7, 136–139). Analysen der Oberflächenladungsverteilung von bereits kristallisierten FNTs legen nahe, dass sie diese Funktion in einer Richtung bevorzugt ausführen (1) (1.1.6). Durch Untersuchungen an Hefe-Zellen, die *PfFNT* exprimieren, konnte gezeigt werden, dass die Substrataufnahme mit zunehmenden Protonengradienten steigt (3, 15). Dabei waren im zellulären System die Membranproteine mit ihren Termini nach innen orientiert und die ermittelten Raten entsprechen dem Substratimport. In Liposomen rekonstituiertes *PfFNT* ist unter den gewählten Herstellungsbedingungen hingegen mit seinen Termini nach außen orientiert (40). Die Substrataufnahme in die *PfFNT*-Liposomen entspricht daher der Richtung des physiologischen Substratexports. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch in dieser Richtung mit steigendem Protonengradienten eine Zunahme des *PfFNT*-vermittelten Substrattransport feststellbar ist (4.4.4.2). Dies lässt sich durch die Anwesenheit von einem oder mehreren Lysinen am zytosolischen Vestibül von *PfFNT* erklären, was einen Substrattransport gemäß des *dielectric-slide*-Mechanismus ermöglicht (Dissertation von Dr. Marie Wiechert). *PfFNT* transportiert Substrate daher bidirektional in Abhängigkeit des Protonengradienten, was im Einklang mit bisherigen Beobachtungen steht (3, 40, 21).

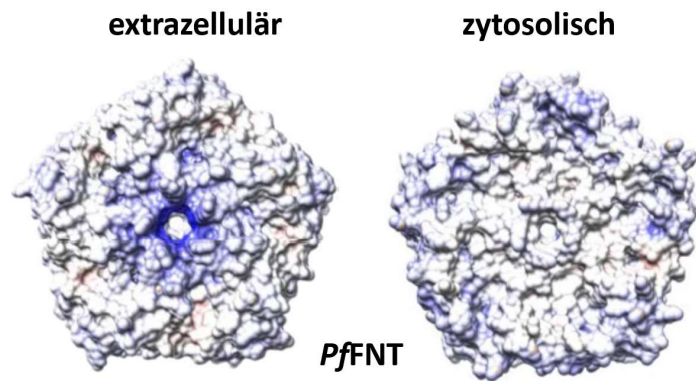


Abbildung 5.3: Poisson-Boltzmann-Elektrostatik-Profile von *PffNT*. Negative Ladungen werden rot und positive Ladungen blau dargestellt. Die Berechnung und Darstellung wurde mit dem APBS *tool* der Chimera© Software durch Dr. Marie Wiechert durchgeführt. Das genutzte Modell von *PffNT* basiert auf FocA (PDB #3KCU) und wurde mit SWISSMODEL© erstellt.

Wie aus Abbildung 5.3 hervorgeht, zeigen die extrazelluläre und zytosolische Oberfläche von *PffNT* keine starken Unterschiede in der Elektrostatik, weshalb der Substrattransport in beide Richtungen ähnlich stark sein könnte. Die Vergleichbarkeit der im zellulären und liposomalen System ermittelten Transportraten von *PffNT* erwies sich als kompliziert (5.1.4). Die Frage, ob der FNT-vermittelte Transport in der Zelle bevorzugt in eine Richtung abläuft, konnte daher nicht endgültig beantwortet werden. Die Direktionalität von FNTs, die unterschiedliche Oberflächenladungen auf zytosolischer und extrazellulärer Seite aufweisen, wird unter Berücksichtigung der elektrostatischen Potentialdifferenz zwischen zytosolischem und extrazellulärem Kompartiment, der anliegenden Substrat- und Protonengradienten in zukünftigen Arbeiten weiter untersucht werden. Eine Möglichkeit bietet dafür das verwendete Liposomen System unter Nutzung alternativer Puffer. Durch Herstellung der Liposomen in einem Puffer der 200 mM Saccharose, 50 mM KCl, 50 mM Substratsalz, 5 mM KCl und 5 mM HEPES (Liposomen-Puffer III) und dem Mischen gleicher Volumina mit einer Lösung, in der entweder KCl durch Substratsalz (Gradienten-Lösung III) oder Substrat-Salz durch KCl (Gradienten-Lösung IV) ersetzt wurden, könnten verschiedene Bedingungen getestet werden. In beiden Fällen werden dabei isotone Messbedingungen und ein 25 mM Substratgradient erzeugt, der bei Gradienten-Lösung III vom Liposomenäußere ins -innere und bei Gradienten-Lösung IV umgekehrt gerichtet ist. Sollte der Transport in beiden Richtungen gleich ablaufen, so würden sich die Transportraten und -kapazitäten nur in ihren Vorzeichen unterscheiden.

5.3 Pharmazeutische Relevanz

Die beiden in dieser Arbeit untersuchten FNTs stammen aus den pharmazeutisch relevanten Erregern *E. histolytica* (*EhFNT*) und der *B. cereus*-Gruppe (*BtFdhC1*). In *E. histolytica* wurde nur ein FNT, in der *B. cereus*-Gruppe hingegen drei putative FNTs gefunden. In Prokaryoten ist ihre Funktion nur unter anaeroben Bedingungen lebenswichtig (1.1.8), während die Vitalität der Eukaryoten unabhängig von den vorherrschenden Bedingungen vom Transport durch FNTs abhängt (1.1.8). Daher wurde der Schwerpunkt der Untersuchungen von FNTs ohne zentrales Histidin auf das eukaryotische *EhFNT* gelegt.

5.3.1 *EhFNT* als *drug target*

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *EhFNT* für den Transport von Monocarboxylate transportiert. *EhFNT* nimmt möglicherweise, wie beschrieben, in den Erregerzellen die physiologische Funktion des Monocarboxylatexports nach fermentativer Energiegewinnung in Kolon und extraintestinales Gewebe oder des Monocarboxylatimports im Kolon ein (57) (1.1.7). Bei Letzterem könnte die Aufnahme von kurzkettigen Fettsäuren wie Acetat, Propionat und Butyrat als Kohlenstoffquelle oder zur Rückgewinnung von NAD^+ auf Kosten eines ATPs dienen [42, 45]. Weil das Expressionslevel von *EhFNT* weitestgehend unabhängig vom Zell-Stadium und dem Glukoselevel ist, liegt die Vermutung nahe, dass der FNT in *E. histolytica* nicht ausschließlich für den Acetat-Export nach der Glykolyse zuständig ist (58, 55) (Abbildung 9.1 Anhang).

Die Beobachtung, dass *E. invadens* Trophozoiten pH-abhängige Acetat-Aufnahme mit zunehmender Aufnahme im Säuern zeigen (140), wurde bisher als Indiz für den verstärkten passiven Transport von ungeladener Säuren ($\text{pK}_s = 4,76$ bei $25\text{ }^\circ\text{C}$) durch die Entamoeben-Membran verstanden. *E. invadens* enthält ein Gen für einen FNT (Gene ID: 14889479), der *EhFNT* stark ähnelt (e-Value $2 \cdot 10^{-114}$), warum sich die Beobachtungen wahrscheinlich durch den pH-abhängigen, FNT-vermittelten Transport erklären lassen.

Da *EhFNT* den einzigen FNT in *E. histolytica* darstellt, könnte eine Hemmung zu effektiver Bekämpfung in verschiedenen Geweben führen. Möglicherweise dient *EhFNT* dabei schon unwissentlich als *drug target* eines bei nicht-invasiver Amöben-Ruhr eingesetzten Medikaments.

Diloxanid-fuorat ein Prodrug eines *EhFNT*-Inhibitors oder -substrates?

Diloxanid-fuorat steht auf der WHO-Liste der unersetzlichen Medikamente und wird zur Bekämpfung nicht-invasiver, luminaler Amöbiasis und nach Behandlung von invasiver Amöbiasis mit Metronidazol eingesetzt (141). Es wird oral verabreicht und im Magen-Darm-Trakt von intestinalen Esterasen hydrolysiert zu Diloxanid und Furan-2-Carbonsäure (142), welche beide amöbozoid wirken; der genaue Wirkmechanismus ist jedoch unklar (143) (Abbildung 5.4). Das Diloxanid wird dabei sehr gut aufgenommen, glukuronidiert und zu 90 % über den Harnweg ausgeschieden (144), während die Furan-2-carbonsäure nicht aufgenommen wird und im Lumen verbleibt und dabei lokal hohe Konzentrationen erreicht

(143). Im Kolon tötet Diloxanid-Fuorat Trophozoiten ab und verhindert die Bildung von Zysten, wirkt jedoch nicht auf Trophozoiten außerhalb des Darmtraktes (145).

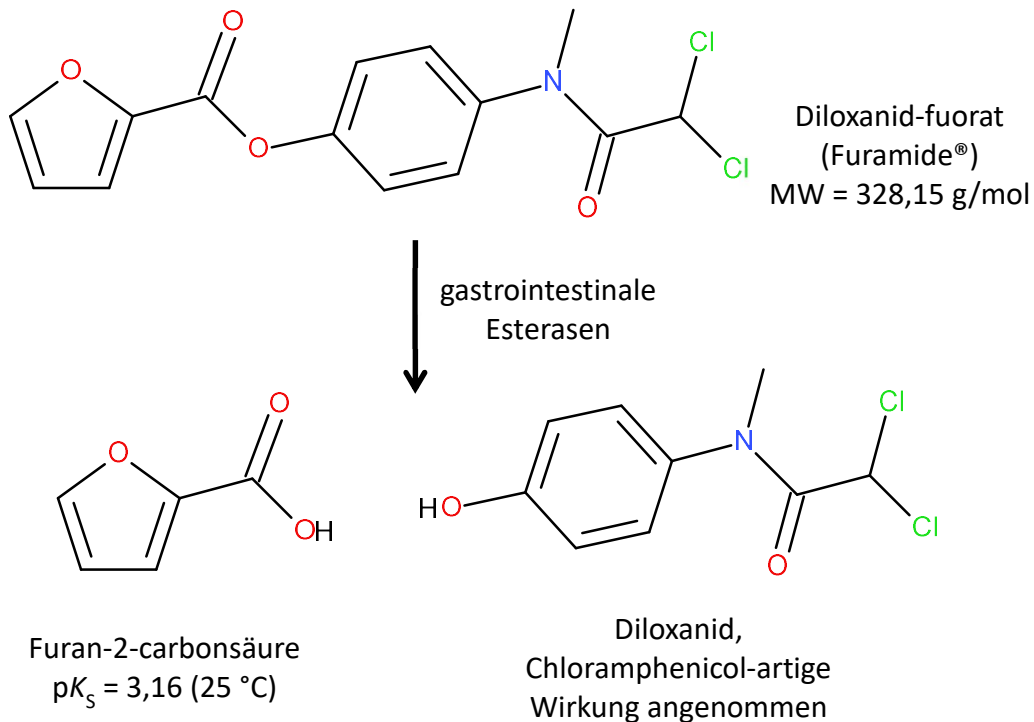
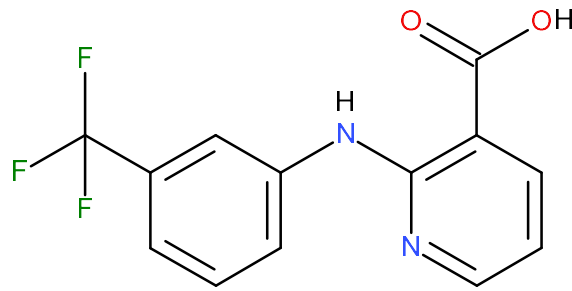


Abbildung 5.4: Metabolisierung des Prodrugs Diloxanid-fuorat zu Furan-2-carbonsäure und Diloxanid im Magen-Darm-Trakt. Abbildung mit Accelrys Draw 4.2 erstellt.

Eine mögliche Ursache für die antiamöbiale Wirksamkeit von Diloxanid-fuorat im Darmlumen stellt die aus dem Prodrug freigesetzte Furan-2-carbonsäure dar, welche möglicherweise nach Aufnahme über *EhFNT* zytotoxisch wirkt, oder durch eine Hemmung von *EhFNT* zum Absterben der Trophozoiten führt. Die aufgestellte Hypothese beruht auf der Erkenntnis, dass durch Carbonsäure-Moleküle der plasmodiale FNT *PfFNT* inhibiert werden kann, was Malariaerregern abtötet (20, 4). Die von Dr. André Golldack im Zuge seiner Doktorarbeit untersuchte Hemmung des L-Laktat-Transports durch Nifluminsäure (Abbildung 5.5) an *PfFNT*-exprimierenden W303-1A $\Delta jen1 \Delta ady2$ *S. cerevisiae*-Zellen könnte dabei eine mögliche Erklärung für die Wirkweise von Diloxanid-fuorat liefern. Die Untersuchungen legen nahe, dass dieser polare Stoff dabei extrazellulär an *PfFNT* angreift. Bei pH 6,8 wurde für Nifluminsäure an *PfFNT* ein IC_{50} -Wert von 72 μ M ermittelt. Eine vollständige Hemmung der L-Laktat-Aufnahme wurde bei einer Konzentration von 1 mM Nifluminsäure erzielt. Nifluminsäure weist dabei strukturelle Ähnlichkeiten zu den Substraten von *PfFNT* Acetat, Formiat und L-Laktat in seiner Säurefunktion auf, welche sich als für die Funktion essenziell erwies. Im Gegensatz zu den kleineren Substraten ist die Carbonsäurefunktion der Nifluminsäure an einen voluminösen Pyridin gebunden. Die Carbonsäurefunktion der Furan-2-Carbonsäure ist an ein Furan gebunden. Da dieser Rest weniger voluminös ist könnte auch eine Aufnahme durch *EhFNT* möglich sein.



Nifluminsäure
 $pK_s = 1,9$ (25 °C)

Abbildung 5.5: Nifluminsäure, Cyclooxygenasehemmstoff, inhibiert *Pf*FNT im μM Bereich (Abbildung mit Accelrys Draw 4.2 erstellt).

Auch Furan-2-carbonsäure könnte sich als niedrig affiner *Pf*FNT- und möglicherweise auch *Eh*FNT-Inhibitor erweisen. Da bei der Amöbiasis-Behandlung mit Diloxanid-fuorat hohe Konzentrationen der freigesetzten Furan-2-carbonsäure im Kolon erzielt werden, könnte diese entscheidend für die Wirkung auf *Entamoeba histolytica* sein. Bei einer Gabe werden Erwachsenen 500 mg des Wirkstoffs gegeben, was bei 2 l Magen-Darm-Lumenflüssigkeit zu einer angenommenen Konzentration von 760 μM Furan-2-carbonsäure nach Hydrolyse im Kolon führt. In der Annahme, dass die Affinität zwischen Furan-2-carbonsäure und *Eh*FNT vergleichbar ist wie die zwischen Niflumin- oder Flufenaminsäure zu *Pf*FNT (72 μM bzw. 160 μM) würde der Transport von Monocarboxylaten aus und in die Entamöben-Trophoziten gestört werden.

Die Wirksamkeitseinschränkung auf nicht-invasive, also im Kolon lokalisierte Amöbiasis weist darauf hin, dass nach der Prodrug-Spaltung nicht das schnell-resorbierte Diloxanid allein, sondern auch die freigesetzte, im Darm-Lumen verbleibende Furan-2-carbonsäure zum Wirkmechanismus beiträgt. Die Transportfähigkeit oder Hemmung der Furan-2-carbonsäure an FNTs ist Gegenstand aktueller Forschung unserer Gruppe.

Sollte sich in Versuchen an *Eh*FNT-Liposomen und *E. histolytica*-Zellen bestätigen, dass Furan-2-Carbonsäure den Transport von Monocarboxylaten hemmt und dadurch zum Absterben von Trophoziten führt, so würde das möglicherweise die Funktionsweise von Diloxanid-Fuorat, dem Mittel der Wahl bei nicht-invasiver Amöbiasis der WHO, erklären (141). Durch weitere Forschungen könnten Arzneistoffe, die an *Eh*FNT angreifen entwickelt werden, welche auch invasive Amöbiasis mit gutem Nebenwirkungsprofil bekämpfen.

5.3.2 *BtFdhC* als *drug target*

Wie gezeigt wurde, kann der FNT *BtFdhC1* aus *B. thuringiensis* Monocarboxylate transportieren. *B. thuringiensis* verfügt wie die anderen Vertreter der *B. cereus*-Gruppe über drei Gene für putative FNTs (1.1.8), wovon nur einer, *BtFdhC1*, die Besonderheit eines zentralen Glutamins aufweist (0), der deshalb im Zuge dieser Arbeit untersucht wurde. Den drei verschiedenen FNTs in *B. thuringiensis* kommen dabei wahrscheinlich verschiedene Aufgaben zu, um der Zelle eine Anpassung an ihre Umwelt zu ermöglichen.

BtFdhC1-3-Gene sind auf verschiedenen Loci der chromosomalen DNA lokalisiert, wie in Abbildung 9.2 im Anhang für *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*-Stamm HD73 (GenBank: CP004069.1 (146)) dargestellt ist. Die bei prokaryotischen FNTs häufige Assoziation mit Genen der im Metabolismus potentieller Substrate involvierten Proteine auf demselben Gen-Abschnitt ist auch bei *B. thuringiensis* zu beobachten (9, 61, 12, 1) (Abbildung 9.3 im Anhang). Bei der Untersuchung der Gen-Loci von *BtFdhC1-3* wurde für das in dieser Arbeit untersuchte *BtFdhC1* eine Assoziation mit für die Bildung der Formiat-Dehydrogenase essenziellen Genen gefunden. Die physiologische Funktion der bisher nicht experimentell untersuchten *BtFdhC2* und *BtFdhC3* lässt sich aufgrund der Lokation auf ihrem Operon vorhersagen. Das *BtFdhC2*-Gen liegt assoziiert mit einem Chitinase-Gen vor. Dies könnte bei der Invasion von *B. thuringiensis* in Insekten nach Expression der Chitinase zu einem Einbau zusätzlicher FNTs führen und eine Anpassung an den erhöhten Bedarf an Metaboliten-Export nach Glykolyse ermöglichen (Abbildung 9.3 B im Anhang). Das *BtFdhC3*-Gen liegt auf demselben Operon wie die Gene von Enzymen, die in der Synthese von Polyhydroxysäuren und der Ausbildung von Granula eine Rolle spielen. *BtFdhC3* scheint bei einem Überangebot an Kohlenstoffquellen bei gleichzeitiger Wachstumslimitierung durch einen Mangel anderer essenzieller Faktoren, wie zum Beispiel dem Fehlen einer Stickstoffquelle, exprimiert zu werden. Dabei bilden die Vertreter der *B. cereus*-Gruppe langkettige Polyhydroxysäuren als Kohlenstoffvorrat, die sie in sogenannten Granula speichern (147) (Abbildung 9.3 C).

Da es sich bei den FNTs der *B. cereus*-Gruppe aufgrund der Redundanz um drei, wenn auch ähnliche *drug targets* handelt und ihre Funktion möglicherweise nur unter bestimmten Bedingungen von essenzieller Bedeutung für das Überleben der Zellen ist, ist davon auszugehen, dass hier die FNTs ein schwächeres *drug target* darstellen als in *E. histolytica*.

5.4 Ausblick

Der Großteil aller bekannten FNTs weist an der zentralen Stelle des Transportpfades ein Histidin auf, welches nicht am Protonierungsschritt des Substrats beteiligt ist (5.2.1). Nur ein kleiner Anteil der FNTs trägt stattdessen andere nicht-protonierbare, polare Aminosäuren (O). Durch die Funktionalität der FNTs ohne zentrales Histidin konnten die von Lü *et al.* und Hub *et al.* postulierten Funktionsmechanismen für FNTs widerlegt werden (5.2.1). Die Abhängigkeit der gemessenen Transportraten vom angelegten Protonengradienten beweist, dass es bei FNTs unabhängig von der zentralen Aminosäure zu einem Proton-Substrat-Symport kommt (5.2.14.4.4.2). Durch die Orientierung der *Pf*FNT-Liposomen konnte für diesen FNT gezeigt werden, dass die pH-Abhängigkeit beide Transportrichtungen betrifft (5.2.7). Die FNTs ohne und mit zentralem Histidin ähneln sich außerdem in ihrer Substratelektivität (5.2.3) und -affinität (5.2.4). Dies legt nahe, dass die Protonierung vor dem Eintritt in die lipophile Kavität aufgrund der Anziehung von Substratanionen durch konservierte Lysine erfolgt und dass der *dielectric-slide*-Mechanismus von Wiechert und Beitz den Transportmechanismus von FNTs richtig beschreibt (1.1.4.2).

Die Direktionalität von FNTs, welche große Unterschiede in der Oberflächenelektrostatik zwischen zytosolischer und extrazellulärer Seite aufweisen, ist für weitere Untersuchungen von Interesse. Möglicherweise bestimmt diese die bevorzugte Transportrichtung solcher FNTs wie beispielsweise FocA oder NirC (1.1.6). Die Direktionalität entsprechender FNTs kann mit Hilfe des Liposomensystems (4.3.3) oder der sekretorischen Vesikel aus NY17-Hefen weiter erforscht werden (4.1). Die Aufreinigung der Vesikel durch Dichteausschlusschromatographie mit dem ÄKTA-Purifier 10 System und einem anschließenden Nachweis einer plasmamembranständigen ATPase würde dabei eine Differenzierung von Mikrosomen und Vesikeln ermöglichen (148). Untersuchungen des Streulichts mit der *stopped-flow*-Apparatur (3.4.3.3) und dem Aufnahme-Assay mit ¹⁴C-markierten Substraten (3.5) sind möglich.

Auch der Einfluss des Membranpotentials auf FNTs ist ein weiteres, bisher weitgehend unerforschtes Feld, das es zu erforschen gilt. In Anbetracht der Tatsache, dass neben der in dieser Arbeit untersuchten Hauptfunktionsweise der FNTs als elektroneutraler Substrat-Anionen-Symporter im Sinne eines passiven Transporters auch kanalartiger elektrogener Anionentransport durch FNTs nachweisbar ist wäre die Untersuchung dieses Phänomens wichtig, um die genaue Funktionsweise der FNTs genauer zu verstehen. Im Liposomensystem konnte durch entgegengesetzte Substrat- und Protonengradienten im basischen Milieu der Transport zum Erliegen gebracht werden (5.2.2), was dafür spricht, dass es bei Anionentransport zur Entstehung eines limitierenden Membranpotentials kommt. Durch Ausgleich des Membranpotentials in diesem Versuch könnte im Weiteren untersucht werden, ob diese Vermutung zutrifft. Eine Möglichkeit wäre dabei der zeitgleiche Einstrom von Substrat-Anionen durch FNT und Kalium-Kationen durch Valinomycin in die Liposomen um einen protonenunabhängigen Ladungsausgleich im Basischen zu erzeugen. Durch elektrophysiologische Methoden könnte außerdem untersucht werden, ob sich der elektrogene Transport durch *Pf*FNT mit bekannten Verbindungen inhibieren lässt.

Die Untersuchung der vermuteten inhibitorischen Wirkungen der wasserlöslichen Substanzen Nifluminsäure und Furan-2-Carbonsäure auf *EhFNT* kann in Zukunft am Liposomen-System realisiert werden, da diese ohne den Einsatz von störenden DMSO auskommen (4.6.1). Möglicherweise stellt die Furan-2-carbonsäure des Prodrugs Diloxanid-Fuorat ein Substrat oder einen Hemmstoff von *EhFNT* dar, was die Wirksamkeit dieses Wirkstoffs bei nicht invasiver Amöbiasis erklären könnte (5.3.1). Ein breites *Screening* von Substanzen könnte dabei der Einsatz von biotinylierten Liposomen, die über Streptavidin an Sensoren eines Biolayer-Interferometers (BLI) gebunden sind, ermöglichen (149). Dabei werden die am Sensor gebundenen Liposomen in Lösungen getaucht, die Substrate enthalten. Führt Substrattransport dabei zu einer Änderung der Liposomengröße, ändert sich das BLI-Signal. Bei Transport-Inhibition bleibt das Signal aus. Erste Versuche zeigten, dass die Anlegung osmotischer Gradienten an Leerliposomen in Abhängigkeit ihrer Stärke und Richtung zu Signalen führt, was eine Voraussetzung für die beschriebene *Screening*-Methode darstellt. Weiterführende Untersuchungen in unserem Arbeitskreis durch den Masterstudenten Bastian Höger konnten diese Beobachtungen bestätigen. Die Evaluierung, ob die FNT-vermittelte Substrataufnahme über ein solches System qualitativ oder quantitativ nachweisbar ist, steht noch aus. Diese innovative und bisher noch nicht beschriebene Methode würde schnelle, umfassende und kostensparende *Screenings* für Substrate und Inhibitoren von in Liposomen rekonstituierten Membranproteinen ermöglichen. Nach erfolgreicher Inhibition oder Aufnahme von Furan-2-Carbonsäure im *in vitro* System wäre die Untersuchung, ob dies im *in vivo* System zytotoxisch auf die Entamoeben Trophozoiten wirkt der nächste Schritt zur Evaluation von *EhFNT* als *drug target*.

Die in der TEM beobachteten FNT-Pentamere weisen darauf hin, dass sich die zellfrei hergestellten FNTs für die Strukturaufklärung eignen könnten (4.2.6). Die Entdeckung geeigneter Kristallisationsbedingungen für die Röntgenstrukturanalyse sowie die Kryoelektronenmikroskopie des *PfFNT* sind Gegenstand aktueller Forschung in unserer Gruppe und liefern Grund zur Hoffnung auf den Erhalt der ersten hochaufgelösten dreidimensionalen Struktur eines eukaryotischen FNT. Später könnte mit *EhFNT* ein weiterer eukaryotischer FNT folgen und auf der Grundlage dieser Daten die rationale Wirkstoffsynthese von *PfFNT*- und *EhFNT*-Inhibitoren betrieben werden.

6 Zusammenfassung

Die Funktionsweise der FNTs ist trotz der großen pharmazeutischen Relevanz der auf sie angewiesenen Organismen bisher wenig erforscht und wurde bisher durch verschiedene, sich gegenseitig ausschließende Mechanismen erklärt. Während die eine Gruppe den für den Substrat-Proton-Symport nötigen Protonierungsschritt des Substrats einem zentralen Histidin im Transportpfad zuschreibt, wird im *dielectric-slide*-Mechanismus die Funktionsweise unabhängig von diesem Histidin erklärt. Hier wird konservierten Lysinen an den Transportpfadeingängen die wichtige Rolle der Substrat-Anion-Anziehung zugeschrieben. Durch die Anziehung in die lipophile Umgebung des Transportereingangs kommt es zur Senkung der Substratazidität und dadurch zur Substratprotonierung durch das Bulk-Wasser.

Das Ziel dieser Arbeit war es zu klären, welcher postulierte Mechanismus den Substrattransport durch FNTs korrekt wiedergibt. Dafür wurden die beiden in der Natur vorkommenden FNTs *EhFNT* aus *E. histolytica* und *BtFdhC1* aus *B. thuringiensis* genutzt, die an der zentralen Position des Transportpfades eine Besonderheit aufweisen. Sie tragen dort statt des üblichen protonierbaren Histidins mit Asparagin (*EhFNT*) oder Glutamin (*BtFdhC1*) nicht protonierbare Aminosäuren. Die Lysine an den Transportpfadeingängen sind dagegen vorhanden. In dieser Arbeit wurden erstmalig FNTs ohne zentrales Histidin untersucht. Dabei wurde durch Streulichtmessungen an FNT-Liposomen festgestellt, dass beide Ziel-FNTs Monocarboxylate wie Formiat, Acetat und Propionat transportieren können und der Substrattransport vom Protonengradienten abhängt. Es konnte zudem gezeigt werden, dass sich die FNTs mit und ohne zentrales Histidin in Bezug auf Substratelektivität und -affinität ähneln. Der weite Selektivitätsfilter des eukaryotischen *EhFNT* transportiert auch voluminöse Substrate wie L-Laktat, wohingegen *BtFdhC1* aufgrund seines schmalen Selektivitätsfilter dazu nicht in der Lage ist. Am Beispiel von *EhFNT* konnte für FNTs ohne zentrales Histidin die FNT-typische niedrige Substrataffinität nachgewiesen werden, was für den Ausschluss von Nicht-Substraten wie Chlorid-Ionen von Bedeutung ist. Würden diese mit hoher Affinität binden, so könnte der Substrattransport durch geringe Mengen an Chlorid inhibiert werden. Durch diese Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass nur der *dielectric-slide*-Mechanismus die Funktionsweise der FNTs korrekt wiedergibt. Da FNTs in Organismen den Import von Substraten oder den Export von metabolischen Endprodukten ermöglichen, sollte in dieser Arbeit auch die Direktionalität von FNTs untersucht werden. Dafür wurde der plasmodiale FNT *PfFNT* untersucht. Dieser ermöglicht bidirektionalen, Protonengradienten-abhängigen Substrattransport. Die Bevorzugung einer Transportrichtung wurde dabei nicht untersucht.

Nach den aus dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen funktionieren FNTs bidirektional nach dem *dielectric-slide*-Mechanismus.

Da *EhFNT* im Gegensatz zu *BtFdhC1* der einzige FNT im Erreger-Genom ist, dieser unabhängig vom Zellstadium und äußeren Bedingungen gleichmäßig auf mRNA-Ebene exprimiert wird und dabei vermutlich den Transport von Metabolismusedukten und -produkten ermöglicht stellt *EhFNT* ein potentiell *drug target* dar.

7 Summary

FNTs are hardly explored even though a variety of pharmaceutical relevant organisms are dependent on them. Their functional mechanism is explained by different mutually exclusive theories. These theories share the idea that FNTs facilitate acid anion transport over lipid membranes via symport with protons but differ in the postulated substrate protonation mechanism, although a small quantity of anions are transported without protons. One group identified a central histidine, located in the FNT transport path, as the key for substrate protonation. Another group postulated the “dielectric slide” mechanism which describes substrate protonation independently of the existence of a central histidine. Here the key amino acids are conserved lysines, located at the entrances of the transport path. They electrostatically attract acid anions which penetrate into the lipophilic path entrance and consequently substrate acidity lowers. Therefore, the substrate gets protonated by the bulk water.

The objective of this research was to clarify which of the postulated mechanisms describes FNT substrate transport correctly. Two natural FNTs were investigated which carry nonprotonable amino acids instead of histidine in the central position. These FNTs were *EhFNT* from *E. histolytica* with a central asparagine, and *BtFdhC1* from *B. thuringiensis* with a central glutamine. Each of them possesses lysines at the transport path entrances. This study examines for the first time FNTs without a central histidine. Both investigated FNTs were reconstituted into liposomes and shown to be able to transport monocarboxylates such as formate, acetate and propionate in a pH-dependent manner. Furthermore, the substrate selectivity and affinity of FNTs with or without central histidine were proved to be similar. The observed low affinity of *EhFNT* plays an important role for the organisms because it prevents transport inhibition by non-substrates such as chloride. The voluminous FNT-substrate L-lactate was transported by *EhFNT* but not by *BtFdhC1* due to the narrower selectivity filter in the prokaryotic FNT. In consequence of these findings the “dielectric slide” mechanism was proved to describe FNT-mediated substrate transport correctly.

Since FNTs enable import or export of substrates and metabolic end products, the second aim of this research was to investigate their directionality. It could be shown that the plasmodial FNT *PfFNT* is able to transport substrates bidirectionally and pH-dependently.

The present results could prove that FNTs function bidirectionally in accordance with the “dielectric slide” mechanism.

There are several observations which indicate *EhFNT* as a potential drug target. Since *EhFNT* is the only FNT in the *Entamoeba histolytica* genome and its mRNA is expressed consistently and independently from cell state and external conditions it might play a key role in the import and export of metabolic educts and products.

8 Literaturverzeichnis

1. Lü, W., Du, J., Schwarzer, N. J., Wacker, T., Andrade, S. L. A., and Einsle, O. (2013) The formate/nitrite transporter family of anion channels. *Biol Chem* **394**, 715-727
2. Atkovska, K., and Hub, J. S. (2017) Energetics and mechanism of anion permeation across formate-nitrite transporters. *Sci Rep* **7**, 12027
3. Wiechert, M., and Beitz, E. (2017) Mechanism of formate-nitrite transporters by dielectric shift of substrate acidity. *EMBO J* **36**, 949-958
4. Marchetti, R. V., Lehane, A. M., Shafik, S. H., Winterberg, M., Martin, R. E., and Kirk, K. (2015) A lactate and formate transporter in the intraerythrocytic malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun* **6**, 6721
5. Wang, Y., Huang, Y., Wang, J., Cheng, C., Huang, W., Lu, P., Xu, Y.-N., Wang, P., Yan, N., and Shi, Y. (2009) Structure of the formate transporter FocA reveals a pentameric aquaporin-like channel. *Nature* **462**, 467–472
6. Waight, A. B., Czyzewski, B. K., and Wang, D.-N. (2013) Ion selectivity and gating mechanisms of FNT channels. *Curr Opin Struct Biol* **23**, 499-506
7. Sawers, G. (1994) The hydrogenases and formate dehydrogenases of *Escherichia coli*. *J Microbiol* **66**, 57-88
8. Das, P., Lahiri, A., Lahiri, A., and 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 (Reading, Engl)* **155**, 2476-2489
9. Peakman, T., Crouzet, J., Mayaux, J. F., Busby, S., Mohan, S., Harborne, N., Wootton, J., Nicolson, R., and 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
10. Saier, M. H., Reddy, V. S., Tsu, B. V., Ahmed, M. S., Li, C., and Moreno-Hagelsieb, G. (2016) The Transporter Classification Database (TCDB): Recent advances. *Nucleic Acids Res* **44**, D372-9
11. Busch, W., and Saier, M. H. (2002) The transporter classification (TC) system, 2002. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **37**, 287-337
12. Suppmann, B., and 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
13. Czyzewski, B. K., and Wang, D.-N. (2012) Identification and characterization of a bacterial hydrosulphide ion channel. *Nature* **483**, 494-497
14. Rycovska, A., Hatahet, L., Fendler, K., and Michel, H. (2012) The nitrite transport protein NirC from *Salmonella typhimurium* is a nitrite/proton antiporter. *Biochim Biophys Acta* **1818**, 1342-1350
15. Wu, B., Rambow, J., Bock, S., Holm-Bertelsen, J., Wiechert, M., Soares, A. B., Spielmann, T., and Beitz, E. (2015) Identity of a *Plasmodium* lactate/H(+) symporter structurally unrelated to human transporters. *Nat Commun* **6**, 6284

16. Wiechert, M., Erler, H., Gollmack, A., and Beitz, E. (2017) A widened substrate selectivity filter of eukaryotic formate-nitrite transporters enables high-level lactate conductance. *FEBS J* **284**, 2663-2673
17. Mukherjee, M., Vajpai, M., and Sankararamakrishnan, R. (2017) Anion-selective Formate/nitrite transporters: Taxonomic distribution, phylogenetic analysis and subfamily-specific conservation pattern in prokaryotes. *BMC Genomics* **18**, 560
18. Leonhartsberger, S., Korsa, I., and Böck, A. (2002) The molecular biology of formate metabolism in enterobacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**, 269-276
19. Mariscal, V., Moulin, P., Orsel, M., Miller, A. J., Fernández, E., and Galván, A. (2006) Differential regulation of the Chlamydomonas Nar1 gene family by carbon and nitrogen. *Protist* **157**, 421-433
20. Gollmack, A., Henke, B., Bergmann, B., Wiechert, M., Erler, H., Blancke Soares, A., Spielmann, T., and Beitz, E. (2017) Substrate-analogous inhibitors exert antimalarial action by targeting the Plasmodium lactate transporter PffNT at nanomolar scale. *PLoS Pathog* **13**, e1006172
21. Hapuarachchi, S. V., Cobbold, S. A., Shafik, S. H., Dennis, A. S. M., McConville, M. J., Martin, R. E., Kirk, K., and Lehane, A. M. (2017) The Malaria Parasite's Lactate Transporter PffNT Is the Target of Antiplasmodial Compounds Identified in Whole Cell Phenotypic Screens. *PLoS Pathog* **13**, e1006180
22. Waight, A. B., Love, J., and Wang, D.-N. (2010) Structure and mechanism of a pentameric formate channel. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 31-37
23. Lü, W., Du, J., Wacker, T., Gerbig-Smentek, E., Andrade, S. L. A., and Einsle, O. (2011) pH-dependent gating in a FocA formate channel. *Science* **332**, 352-354
24. Lü, W., Schwarzer, N. J., Du, J., Gerbig-Smentek, E., Andrade, S. L. A., and Einsle, O. (2012) Structural and functional characterization of the nitrite channel NirC from Salmonella typhimurium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 18395-18400
25. Benkert, P., Biasini, M., and Schwede, T. (2011) Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* **27**, 343-350
26. Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L., and Schwede, T. (2017) Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Sci Rep* **7**, 10480
27. Guex, N., Peitsch, M. C., and Schwede, T. (2009) Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis* **30**, S162-73
28. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., Beer, T. A. P. de, Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., and Schwede, T. (2018) SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* **46**, W296-W303
29. Falke, D., Schulz, K., Doberenz, C., Beyer, L., Lilie, H., Thiemer, B., and Sawers, R. G. (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

30. Walz, T., Hirai, T., Murata, K., Heymann, J. B., Mitsuoka, K., Fujiyoshi, Y., Smith, B. L., Agre, P., and Engel, A. (1997) The three-dimensional structure of aquaporin-1. *Nature* **387**, 624-627
31. Stroud, R. M., Miercke, L. J. W., O'Connell, J., Khademi, S., Lee, J. K., Remis, J., Harries, W., Robles, Y., and Akhavan, D. (2003) Glycerol facilitator GlpF and the associated aquaporin family of channels. *Curr Opin Struct Biol* **13**, 424-431
32. Stebbins, C. E., and Galán, J. E. (2001) Structural mimicry in bacterial virulence. *Nature* **412**, 701-705
33. Heijne, G. von, and Gavel, Y. (1988) Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur J Biochem* **174**, 671-678
34. Beckwith, J. (2013) The Sec-dependent pathway. *Res Microbiol* **164**, 497-504
35. Lü, W., Du, J., Schwarzer, N. J., Gerbig-Smentek, E., Einsle, O., and Andrade, S. L. A. (2012) The formate channel FocA exports the products of mixed-acid fermentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 13254-13259
36. Smart, O. S., Neduvellil, J. G., Wang, X., Wallace, B. A., and Sansom, M. S.P. (1996) HOLE: A program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models. *J Mol Graph Model* **14**, 354-360
37. Lv, X., Liu, H., Ke, M., and Gong, H. (2013) Exploring the pH-dependent substrate transport mechanism of FocA using molecular dynamics simulation. *Biophys J* **105**, 2714-2723
38. Feng, Z., Hou, T., and Li, Y. (2012) Concerted movement in pH-dependent gating of FocA from molecular dynamics simulations. *J Chem Inf Model* **52**, 2119-2131
39. Wiechert, M., and Beitz, E. (2017) Formate-nitrite transporters: Monoacids ride the dielectric slide. *Channels (Austin)* **11**, 365-367
40. Holm-Bertelsen, J., Bock, S., Helmstetter, F., and 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
41. Rosenbaum, R. M., and Wittner, M. (1970) Ultrastructure of bacterized and axenic trophozoites of *Entamoeba histolytica* with particular reference to helical bodies. *J Cell Biol* **45**, 367-382
42. Roger, A. J., and Silberman, J. D. (2002) Cell evolution: Mitochondria in hiding. *Nature* **418**, 827-829
43. Mi-ichi, F., Abu Yousuf, M., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2009) Mitosomes in *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 21731-21736
44. Nozaki, T., and Bhattacharya, A., Eds. (2015) *Amebiasis: Biology and Pathogenesis of Entamoeba*, Springer Japan, Tokyo
45. Serrano, R., and Reeves, R. E. (1974) Glucose transport in *Entamoeba histolytica*. *Biochem J* **144**, 43-48
46. Serrano, R., and Reeves, R. E. (1975) Physiological significance of glucose transport in *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol* **37**, 411-416

47. Bringaud, F., Ebikeme, C., and Boshart, M. (2010) Acetate and succinate production in amoebae, helminths, diplomonads, trichomonads and trypanosomatids: Common and diverse metabolic strategies used by parasitic lower eukaryotes. *Parasitology* **137**, 1315-1331
48. Reeves, R. E., Warren, L. G., Susskind, B., and Lo, H. S. (1977) An energy-conserving pyruvate-to-acetate pathway in *Entamoeba histolytica*. Pyruvate synthase and a new acetate thiokinase. *J Biol Chem* **252**, 726-731
49. Pineda, E., Encalada, R., Olivos-García, A., Néquiz, M., Moreno-Sánchez, R., and Saavedra, E. (2013) The bifunctional aldehyde-alcohol dehydrogenase controls ethanol and acetate production in *Entamoeba histolytica* under aerobic conditions. *FEBS Lett* **587**, 178-184
50. Montalvo, F. E., Reeves, R. E., and Warren, L. G. (1971) Aerobic and anaerobic metabolism in *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol* **30**, 249-256
51. Zuo, X., and Coombs, G. H. (1995) Amino acid consumption by the parasitic, amoeboid protists *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *FEMS Microbiol Lett* **130**, 253-258
52. Takeuchi, T., Weinbach, E. C., Gottlieb, M., and Diamond, L. S. (1979) Mechanism of l-serine oxidation in *Entamoeba histolytica*. *Comp Biochem Physiol Part B: Comparative Biochemistry* **62**, 281-285
53. Anderson, I. J., and Loftus, B. J. (2005) *Entamoeba histolytica*: Observations on metabolism based on the genome sequence. *Exp Parasitol* **110**, 173-177
54. Pineda, E., Encalada, R., Vázquez, C., Néquiz, M., Olivos-García, A., Moreno-Sánchez, R., and Saavedra, E. (2015) In vivo identification of the steps that control energy metabolism and survival of *Entamoeba histolytica*. *FEBS J* **282**, 318-331
55. Baumel-Alterzon, S., Weber, C., Guillén, N., and Ankri, S. (2013) Identification of dihydropyrimidine dehydrogenase as a virulence factor essential for the survival of *Entamoeba histolytica* in glucose-poor environments. *Cell Microbiol* **15**, 130-144
56. Hirayama, A., Kami, K., Sugimoto, M., Sugawara, M., Toki, N., Onozuka, H., Kinoshita, T., Saito, N., Ochiai, A., Tomita, M., Esumi, H., and Soga, T. (2009) Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res* **69**, 4918-4925
57. Dang, T. (2017) *Acetate Metabolism: The physiological role of ADP-forming acetyl-CoA synthetase and acetate kinase in Entamoeba histolytica*. Dissertation, Clemson University
58. Ehrenkauf, G. M., Haque, R., Hackney, J. A., Eichinger, D. J., and Singh, U. (2007) Identification of developmentally regulated genes in *Entamoeba histolytica*: Insights into mechanisms of stage conversion in a protozoan parasite. *Cell Microbiol* **9**, 1426-1444
59. Gilchrist, C. A., Houpt, E., Trapaidze, N., Fei, Z., Crasta, O., Asgharpour, A., Evans, C., Martino-Catt, S., Baba, D. J., Stroup, S., Hamano, S., Ehrenkauf, G., Okada, M., Singh, U., Nozaki, T., Mann, B. J., and Petri, W. A. (2006) Impact of intestinal colonization and invasion on the *Entamoeba histolytica* transcriptome. *Mol Biochem Parasitol* **147**, 163-176

60. Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alsmark, U. C. M., Samuelson, J., Amedeo, P., Roncaglia, P., Berriman, M., Hirt, R. P., Mann, B. J., Nozaki, T., Suh, B., Pop, M., Duchene, M., Ackers, J., Tannich, E., Leippe, M., Hofer, M., Bruchhaus, I., Willhoeft, U., Bhattacharya, A., Chillingworth, T., Churcher, C., Hance, Z., Harris, B., Harris, D., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Squares, R., Whitehead, S., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Norbertczak, H., Price, C., Wang, Z., Guillén, N., Gilchrist, C., Stroup, S. E., Bhattacharya, S., Lohia, A., Foster, P. G., Sicheritz-Ponten, T., Weber, C., Singh, U., Mukherjee, C., El-Sayed, N. M., Petri, W. A., Clark, C. G., Embley, T. M., Barrell, B., Fraser, C. M., and Hall, N. (2005) The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* **433**, 865-868
61. White, W. B., and Ferry, J. G. (1992) Identification of formate dehydrogenase-specific mRNA species and nucleotide sequence of the *fdhC* gene of *Methanobacterium formicum*. *J Bacteriol* **174**, 4997-5004
62. Jia, W., Tovell, N., Clegg, S., Trimmer, M., and 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
63. Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., and Soberón, M. (2011) *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol* **41**, 423-431
64. Rasko, D. A., Altherr, M. R., Han, C. S., and Ravel, J. (2005) Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 303-329
65. Helgason, E., Okstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I., and Kolstø, A. B. (2000) *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* - one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2627-2630
66. Le Lay, J., Bahloul, H., Sérino, S., Jobin, M., and Schmitt, P. (2015) Reducing activity, glucose metabolism and acid tolerance response of *Bacillus cereus* grown at various pH and oxydo-reduction potential levels. *Food Microbiol* **46**, 314-321
67. Rosenfeld, E., Duport, C., Zigha, A., and Schmitt, P. (2005) Characterization of aerobic and anaerobic vegetative growth of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* F4430/73 strain. *Can J Microbiol* **51**, 149-158
68. Chai, Y., Kolter, R., and Losick, R. (2009) A widely conserved gene cluster required for lactate utilization in *Bacillus subtilis* and its involvement in biofilm formation. *J Bacteriol* **191**, 2423-2430
69. Chaptal, V., Kwon, S., Sawaya, M. R., Guan, L., Kaback, H. R., and Abramson, J. (2011) Crystal structure of lactose permease in complex with an affinity inactivator yields unique insight into sugar recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 9361-9366
70. Wei, Y., Guffanti, A. A., Ito, M., and Krulwich, T. A. (2000) *Bacillus subtilis* Yqkl is a novel malic/Na⁺-lactate antiporter that enhances growth on malate at low protonmotive force. *J Biol Chem* **275**, 30287-30292
71. Halestrap, A. P. (2012) The monocarboxylate transporter family-Structure and functional characterization. *IUBMB Life* **64**, 1-9
72. Dong, X., Stothard, P., Forsythe, I. J., and Wishart, D. S. (2004) PlasMapper: A web server for drawing and auto-annotating plasmid maps. *Nucleic Acids Res* **32**, W660-4

73. Daniel Gietz, R., and Woods, R. A. (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. In Guthrie, C., Ed. *Guide to yeast genetics and molecular and cell biology*, Amsterdam, Acad. Press
74. Walworth, N. C. (1987) Purification and characterization of constitutive secretory vesicles from yeast. *J Cell Biol* **105**, 163-174
75. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467
76. Dagert, M., and Ehrlich, S. D. (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**, 23-28
77. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254
78. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
79. Renart, J., Reiser, J., and Stark, G. R. (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 3116-3120
80. Schwarz, D., Klammt, C., Koglin, A., Löhr, F., Schneider, B., Dötsch, V., and Bernhard, F. (2007) Preparative scale cell-free expression systems: New tools for the large scale preparation of integral membrane proteins for functional and structural studies. *Methods* **41**, 355-369
81. Müller-Lucks, A., Bock, S., Wu, B., and Beitz, E. (2012) Fluorescent in situ folding control for rapid optimization of cell-free membrane protein synthesis. *PLoS ONE* **7**, e42186
82. Schneider, B., Junge, F., Shirokov, V. A., Durst, F., Schwarz, D., Dötsch, V., and Bernhard, F. (2010) Membrane protein expression in cell-free systems. *Methods Mol Biol* **601**, 165-186
83. Crowe, J., Döbeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stüber, D., and Henco, K. (1994) 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods Mol Biol* **31**, 371-387
84. Bornhorst, J. A., and Falke, J. J. (2000) Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Meth Enzymol* **326**, 245-254
85. Harris, J. R. (1969) Some negative contrast staining features of a protein from erythrocyte ghosts. *J Mol Biol* **46**, 329-335
86. Harris, J. R. (1991) Negative staining-carbon film technique: New cellular and molecular applications. *J Electron Microscop Tech* **18**, 269-276
87. Harris, J. R. (1999) Negative staining of thinly spread biological particulates. *Methods Mol Biol* **117**, 13-30
88. Arnold, P., Himmels, P., Weiß, S., Decker, T.-M., Markl, J., Gatterdam, V., Tampé, R., Bartholomäus, P., Dietrich, U., and Dürr, R. (2014) Antigenic and 3D structural characterization of soluble X4 and hybrid X4-R5 HIV-1 Env trimers. *Retrovirology* **11**, 42

89. Tang, G., Peng, L., Baldwin, P. R., Mann, D. S., Jiang, W., Rees, I., and Ludtke, S. J. (2007) EMAN2: An extensible image processing suite for electron microscopy. *J Struct Biol* **157**, 38-46
90. Rigaud, J. L., Paternostre, M. T., and Bluzat, A. (2002) Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 2. Incorporation of the light-driven proton pump bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **27**, 2677-2688
91. Borgnia, M. J., Kozono, D., Calamita, G., Maloney, P. C., and Agre, P. (1999) Functional reconstitution and characterization of AqpZ, the E. coli water channel protein. *J Mol Biol* **291**, 1169-1179
92. Clement, N. R., and Gould, J. M. (1981) Pyranine (8-hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonate) as a probe of internal aqueous hydrogen ion concentration in phospholipid vesicles. *Biochemistry* **20**, 1534-1538
93. Albers, S. V., Konings, W. N., and Driessen, A. J. M. Membranes of Thermophiles and Other Extremophiles. *Methods in Microbiology* **35**, 161-171
94. Damiano, E., Bassilana, M., Rigaud, J.-L., and Leblanc, G. (1984) Use of the pH sensitive fluorescence probe pyranine to monitor internal pH changes in Escherichia coli membrane vesicles. *FEBS Lett* **166**, 120-124
95. Gibrat, R., and Grignon, C. Liposomes with Multiple Fluorophores for Measurement of Ionic Fluxes, Selectivity, and Membrane Potential. *Methods in Enzymology* **372**, 166-186.
96. Kano, K., and Fendler, J. H. (1978) Pyranine as a sensitive pH probe for liposome interiors and surfaces. pH gradients across phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta* **509**, 289-299
97. Paxton, W. F., McAninch, P. T., Achyuthan, K. E., Shin, S. H. R., and Monteith, H. L. (2017) Monitoring and modulating ion traffic in hybrid lipid/polymer vesicles. *Colloids Surf B Biointerfaces* **159**, 268-276
98. Paxton, W. F., Price, D., and Richardson, N. J. (2013) Hydroxide ion flux and pH-gradient driven ester hydrolysis in polymer vesicle reactors. *Soft Matter* **9**, 11295
99. Paula, S., Volkov, A. G., van Hoek, A. N., Haines, T. H., and Deamer, D. W. (1996) Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness. *Biophys J* **70**, 339-348
100. Casadio, R. (1991) Measurements of transmembrane pH differences of low extents in bacterial chromatophores. *Eur Biophys J* **19**, 189-201
101. Feng, L., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2012) Molecular mechanism of proton transport in CLC Cl⁻/H⁺ exchange transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 11699-11704
102. Gerdes, B., Rixen, R. M., Kramer, K., Forbrig, E., Hildebrandt, P., and Steinem, C. (2018) Quantification of Hv1-induced proton translocation by a lipid-coupled Oregon Green 488-based assay. *Anal Bioanal Chem* **410**, 6497-6505
103. Han, J., and Burgess, K. (2010) Fluorescent indicators for intracellular pH. *Chem Rev* **110**, 2709-2728

104. Marty, A., Bourdeaux, M., Dell'Amico, M., and Viallet, P. (1986) 9-amino-2-methoxy-6-chloroacridine monocation fluorescence analysis by phase-modulation fluorometry. *Eur Biophys J* **13**, 251–257
105. Nilsson, T., Lundin, C. R., Nordlund, G., Ädelroth, P., Ballmoos, C. von, and Brzezinski, P. (2016) Lipid-mediated Protein-protein Interactions Modulate Respiration-driven ATP Synthesis. *Sci Rep* **6**, 24113
106. Palmgren, M. G. (1991) Acridine orange as a probe for measuring pH gradients across membranes: Mechanism and limitations. *Anal Biochem* **192**, 316–321
107. Steimle, S., Bajzath, C., Dörner, K., Schulte, M., Bothe, V., and Friedrich, T. (2011) Role of subunit NuoL for proton translocation by respiratory complex I. *Biochemistry* **50**, 3386–3393
108. Uzdavinys, P., Coinçon, M., Nji, E., Ndi, M., Winkelmann, I., Ballmoos, C. von, and Drew, D. (2017) Dissecting the proton transport pathway in electrogenic Na⁺/H⁺ antiporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E1101–E1110
109. Lee, S.-Y., Letts, J. A., and MacKinnon, R. (2009) Functional reconstitution of purified human Hv1 H⁺ channels. *J Mol Biol* **387**, 1055–1060
110. Yakata, K., Hiroaki, Y., Ishibashi, K., Sohara, E., Sasaki, S., Mitsuoka, K., and Fujiyoshi, Y. (2007) Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 688–693
111. Schmidt, P. C., Müller, R. H., Schuhmann, R. (1998) Teilchengrößenmessung der Laborpraxis. *Pharmazie in unserer Zeit* **27**, 78–191
112. Malvern Instruments *FAQ: What is the Z average?*
113. Calamita, G., Gena, P., Meleleo, D., Ferri, D., and Svelto, M. (2006) Water permeability of rat liver mitochondria: A biophysical study. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 1018–1024
114. Mie, G. (1908) Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Ann Phys (Leipzig)* **330**, 377–445
115. Fu, D. (2000) Structure of a Glycerol-Conducting Channel and the Basis for Its Selectivity. *Science* **290**, 481–486
116. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S.'e., Wilkins, M. R., Appel, R. D., and Bairoch, A. (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the EXPASY Server. In Walker, J. M., Ed. *The Proteomics Protocols Handbook*, 571–607
117. Klammt, C., Schwarz, D., Eifler, N., Engel, A., Piehler, J., Haase, W., Hahn, S., Dötsch, V., and Bernhard, F. (2007) Cell-free production of G protein-coupled receptors for functional and structural studies. *J Struct Biol* **158**, 482–493
118. Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M., Prendergast, F. G., and Ward, W. W. (1993) Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein. *Biochemistry* **32**, 1212–1218
119. Newby, Z. E. R., O'Connell, J. D., Gruswitz, F., Hays, F. A., Harries, W. E. C., Harwood, I. M., Ho, J. D., Lee, J. K., Savage, D. F., Miercke, L. J. W., and Stroud, R. M. (2009) A general protocol for the crystallization of membrane proteins for X-ray structural investigation. *Nat Protoc* **4**, 619–637

120. Fritz, E. (2007) Dynamische Lichtstreuung zur Partikelgrößenbestimmung von CuZn-Hydroxykarbonaten. *Diplomarbeit*, Technische Fachhochschule Berlin
121. Lapinski, M. M., Castro-Forero, A., Greiner, A. J., Ofoli, R. Y., and Blanchard, G. J. (2007) Comparison of liposomes formed by sonication and extrusion: Rotational and translational diffusion of an embedded chromophore. *Langmuir* **23**, 11677-11683
122. Walworth, N. C., and Novick, P. J. (1987) Purification and characterization of constitutive secretory vesicles from yeast. *J Cell Biol* **105**, 163-174
123. Briuglia, M.-L., Rotella, C., McFarlane, A., and Lamprou, D. A. (2015) Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Deliv Transl Res* **5**, 231-242
124. Kumal, R. R., Nguyenhuu, H., Winter, J. E., McCarley, R. L., and Haber, L. H. (2017) Impacts of Salt, Buffer, and Lipid Nature on Molecular Adsorption and Transport in Liposomes As Observed by Second Harmonic Generation. *J Phys Chem A* **121**, 15851–15860
125. Moore, S. A., Harris, A. A., and Palepu, R. M. (2007) Spectroscopic investigations on the binding of ammonium salt of 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid with non-ionic surfactant micelles in aqueous media. *Fluid Phase Equilib* **251**, 110-113
126. Erler, H., Ren, B., Gupta, N., and Beitz, E. (2018) The intracellular parasite *Toxoplasma gondii* harbors three druggable FNT-type formate and l-lactate transporters in the plasma membrane. *J Biol Chem* **293**, 17622-17630
127. Hunger, D., Doberenz, C., and Sawers, R. G. (2014) Identification of key residues in the formate channel FocA that control import and export of formate. *Biol Chem* **395**, 813-825
128. Wree, D., Wu, B., Zeuthen, T., and Beitz, E. (2011) Requirement for asparagine in the aquaporin NPA sequence signature motifs for cation exclusion. *FEBS J* **278**, 740-748
129. Carbrey, J. M., Gorelick-Feldman, D. A., Kozono, D., Praetorius, J., Nielsen, S., and Agre, P. (2003) Aquaglyceroporin AQP9: Solute permeation and metabolic control of expression in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2945-2950
130. Andreoli, T. E., Brown, A. M., Fambrough, D. M., Hoffman, J. F., Schultz, S., Welsh, M. J. (1996) *Molecular biology of membrane transport disorders*, Plenum Press, New York
131. Severs, N. J. (2007) Freeze-fracture electron microscopy. *Nat Protoc* **2**, 547-576
132. Harpaz, Y., Gerstein, M., and Chothia, C. (1994) Volume changes on protein folding. *Structure* **2**, 641-649
133. Cools, A. A., and Janssen, L. H. (1986) Fluorescence response of acridine orange to changes in pH gradients across liposome membranes. *Experientia* **42**, 954-956
134. Fan, P., Haerd, T., and Kearns, D. R. (1989) Origin of the complex fluorescence emission of 9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine. *J Phys Chem A* **93**, 6615-6622
135. Ishii, F., and Nii, T. (2014) Lipid emulsions and lipid vesicles prepared from various phospholipids as drug carriers. In Ohshima, H., Makino, K., Eds. *Colloid and interface science in pharmaceutical research and development*, Amsterdam, Elsevier
136. Sawers, R. G. (2005) Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans* **33**, 42-46

137. Unkles, S. E., Symington, V. F., Kotur, Z., Wang, Y., Siddiqi, M. Y., Kinghorn, J. R., and Glass, A. D. M. (2011) Physiological and biochemical characterization of AnNitA, the *Aspergillus nidulans* high-affinity nitrite transporter. *Eukaryotic Cell* **10**, 1724-1732
138. Vitvitsky, V., Kabil, O., and Banerjee, R. (2012) High turnover rates for hydrogen sulfide allow for rapid regulation of its tissue concentrations. *Antioxid Redox Signal* **17**, 22-31
139. Beyer, L., Doberenz, C., Falke, D., Hunger, D., Suppmann, B., and Sawers, R. G. (2013) Coordination of FocA and pyruvate formate-lyase synthesis in *Escherichia coli* demonstrates preferential translocation of formate over other mixed-acid fermentation products. *J Bacteriol* **195**, 1428-1435
140. Byers, J., and Eichinger, D. (2008) Acetylation of the *Entamoeba* histone H4 N-terminal domain is influenced by short-chain fatty acids that enter trophozoites in a pH-dependent manner. *Int J Parasitol* **38**, 57-64
141. WHO Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines (2017) *The selection and use of essential medicines: Report of the WHO Expert Committee, 2017 (including the 20th WHO Model List of Essential Medicines and the 6th WHO Model List of Essential Medicines for Children)*, WHO, Geneva
142. Gadkariem, E. A., Belal, F., Abounassif, M. A., El-Obeid, H. A., and Ibrahim, K. (2004) Stability studies on diloxanide furoate: Effect of pH, temperature, gastric and intestinal fluids. *Farmaco* **59**, 323-329
143. Kuhlmann, F. M., and Fleckenstein, J. M., Eds. (2017) *Infectious Diseases: Antiparasitic Agents*, Elsevier
144. (1995) *Drugs used in parasitic diseases*, 2nd Ed., World Health Organization, Geneva
145. Gupta, Y. K., Gupta, M., Aneja, S., and Kohli, K. (2004) Current drug therapy of protozoal diarrhoea. *Indian J Pediatr* **71**, 55-58
146. Liu, G., Song, L., Shu, C., Wang, P., Deng, C., Peng, Q., Lereclus, D., Wang, X., Huang, D., Zhang, J., and Song, F. (2013) Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD73. *Genome Announc* **1**, e0008013
147. Chen, D., Xu, D., Li, M., He, J., Gong, Y., Wu, D., Sun, M., and Yu, Z. (2012) Proteomic analysis of *Bacillus thuringiensis* Δ phaC mutant BMB171/PHB(-1) reveals that the PHB synthetic pathway warrants normal carbon metabolism. *J Proteomics* **75**, 5176-5188
148. Nakamoto, R. K., Rao, R., and Slayman, C. W. (1991) Expression of the yeast plasma membrane H⁺ATPase in secretory vesicles. A new strategy for directed mutagenesis. *J Biol Chem* **266**, 7940-7949
149. Rich, R. L., and Myszka, D. G. (2007) Higher-throughput, label-free, real-time molecular interaction analysis. *Anal Biochem* **361**, 1-6

9 Anhang

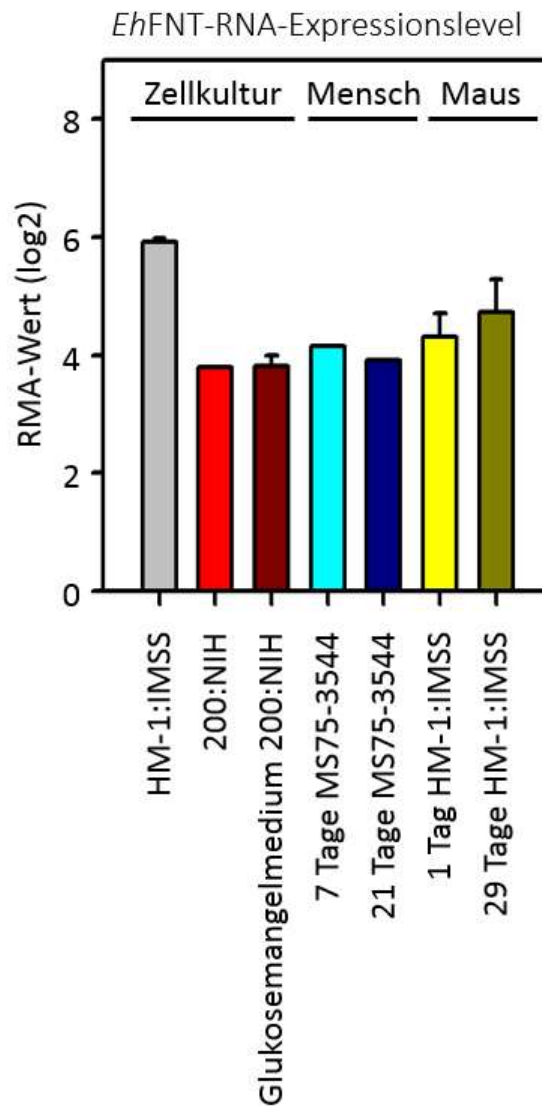


Abbildung 9.1: *EhFNT* mRNA-Expressionslevel in Zellkultur und Colons verschiedener Organismen. RMA (*Robust Multiarray Average*, relative RNA-Expression (log₂)) aufgetragen gegen Bedingung und *E. histolytica*-Stamm (HM-1:MSS, 200:NIH, MS75-3544). Referenzstamm HM-1:MSS Trophozoiten in Zellkulturmedium (grau). Glukosemangel hat kein Einfluss auf *EhFNT*-Expressionslevel von Trophozoiten in Zellkultur (rot) (58, 55). Trophozoiten und Zysten in humanen Colon zeigen zwischen einer und drei Wochen ähnliche *EhFNT*-Expression (blau) (58). In murinen Colon ist zwischen 1 und 29 Tagen nach Infektion mit Trophozoiten ein nicht signifikanter Anstieg an *EhFNT*-mRNA zu sehen (gelb) (59).

Lokalisation der redundanten FNTs *BtFdhC1-3* aus *B. thuringiensis* auf dem Chromosom, sowie die durch bioinformatische Methoden erkannten Co-Lokationen mit anderen Genen auf denselben Operons.

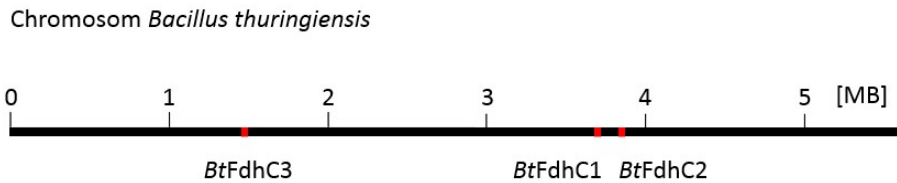


Abbildung 9.2: Lokation der drei FNTs aus *B. thuringiensis* auf dem Chromosom. Dargestellt ist die chromosomale *B. thuringiensis*-DNA (5646799 bp), rote Striche markieren Loci der *BtFdhC*-Gene, angezeigte Skalierung in Megabasenpaaren (MB). Daten entnommen aus der NCBI-Datenbank und mit Microsoft® Office PowerPoint® visualisiert.

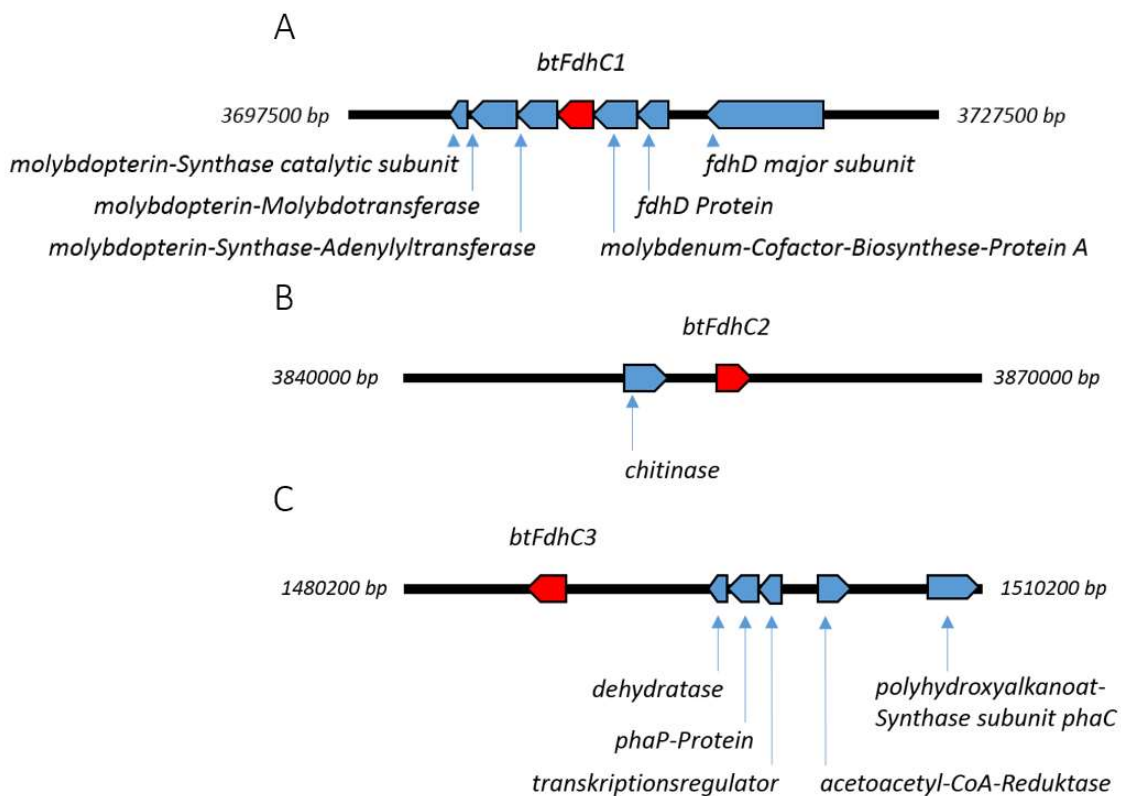


Abbildung 9.3: (A) *BtFdhC1*-, (B) *BtFdhC2*- und (C) *BtFdhC3*-Gen-Loci (rot) in der Vergrößerung. Jeweils 30.000 Basenpaar-Abschnitte gezeigt. Daten entnommen aus der NCBI-Datenbank und mit Microsoft® Office PowerPoint® visualisiert.

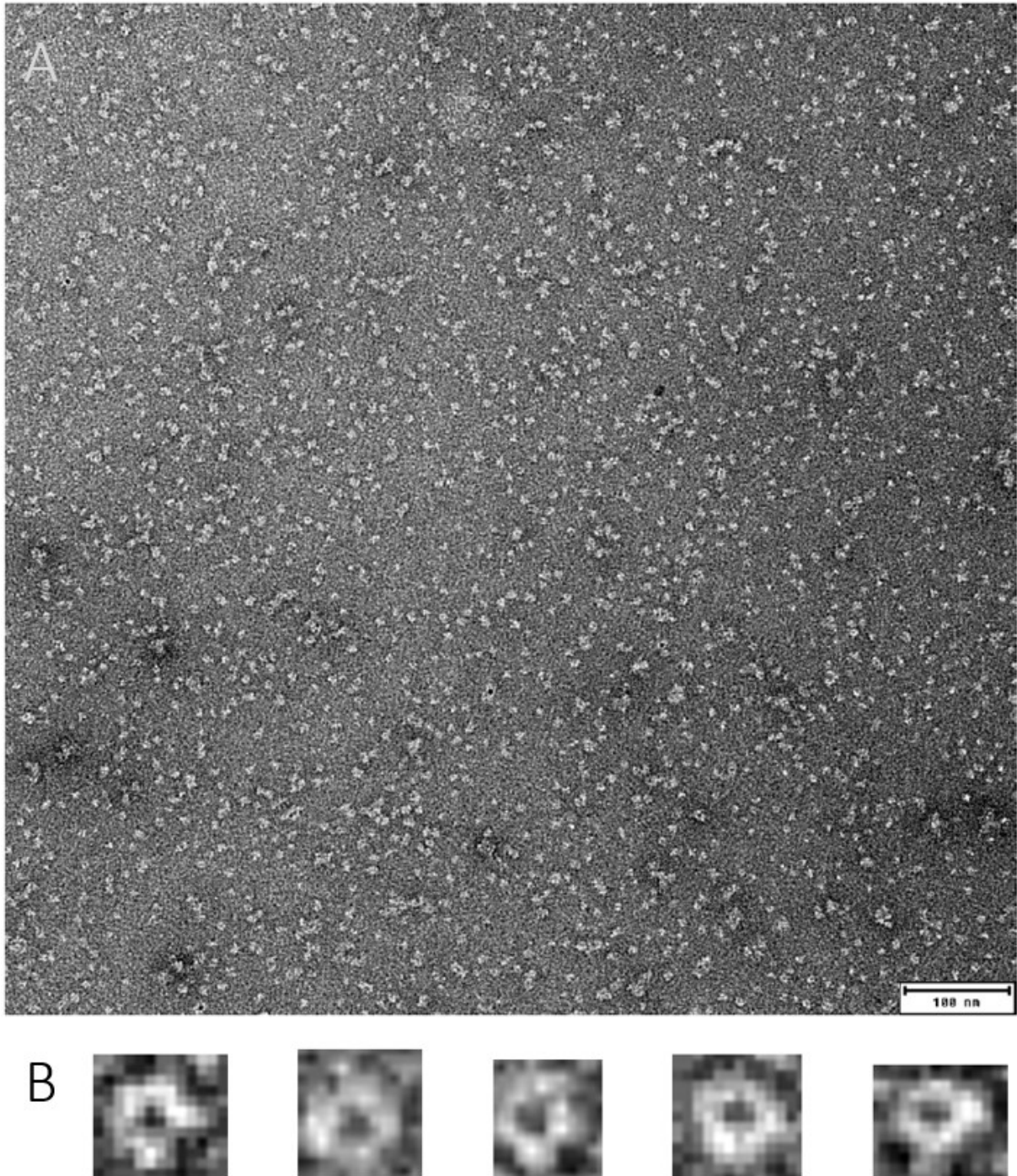


Abbildung 9.5: PfFNT-Protein in Brij® 78-Mizellen. (A) Aufnahme im Transmissionselektronenmikroskop nach 3.3.9. (B) Vierfache Vergrößerung der PfFNT-Pentamer-Strukturen ohne Klassensummenbildung.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere 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. Die Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ich versichere des Weiteren, dass mir keine akademischer Grad entzogen wurde.

Ein Teil dieser Arbeit wurde unter den folgenden Titeln publiziert:

F. Helmstetter, P. Arnold, B. Höger, L.M. Petersen, E. Beitz

“Formate-nitrite transporters carrying nonprotonatable amide amino acids Instead of a central histidine maintain pH-dependent transport”

The Journal of Biological Chemistry **2018**, jbc.RA118.006340

J. Holm-Bertelsen, S. Bock, F. Helmstetter, E. Beitz

“High-level cell-free production of the malarial lactate transporter *PfFNT* as a basis for crystallization trials and directional transport studies.”

Protein Expression and Purification **2016**, 126, 109-114.

Ich erkläre, dass die hier vorliegende Arbeit gemäß den Grundsätzen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgesellschaft erstellt wurde.

Folkhard Helmstetter

Kiel, Januar 2019

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Allen bedanken, die mir die wissenschaftliche Arbeit in den letzten drei Jahren ermöglicht haben. Allen voran möchte ich Eric Beitz für das spannende Thema und die gute Betreuung danken, die mir so manches mal half mich nicht in den interessanten Nebengassen auf der Straße zur Promotion zu verlaufen. Ich möchte auch meinen Vorgängern Marie, Julia v.B. und JHB für die wichtige Unterstützung bei wissenschaftlichen Themen und die Einarbeitung ins Zellfrei- und Liposomen-System danken. Philipp Arnold danke ich für seine Hilfe am TEM und Holger Erler für viele wichtige Tipps und Diskussionen rund um die Doktorarbeit. Auch Lea Petersen möchte ich für ihre Unterstützung herzlich danken: ohne deine wache und belebte Art hätten wir es nicht geschafft die Liposomendichtigkeit und die Verlässlichkeit der Protein-Rekonstitution zu erhöhen. Außerdem danke ich Lea für ihre tolle Korrekturarbeit und die vielen wissenschaftlichen Gespräche die wir hatten. Bastian Höger gilt ein großer Dank, denn durch seine Begeisterungsfähigkeit, Durchhaltevermögen und schnelle Auffassungsgabe wurde es möglich wichtige abschließende Experimente durchzuführen. Ich möchte Holger und Anna Meyer für ihre Hilfe im Isotopenlabor danken und Anna Fuchs gilt mein Dank für so einige Maxi- und Minipräparationen. Björn Henke möchte ich neben der Hilfe mit Sequenzierung und den lustigen Abenden auch für seine Hilfe im Praktikum danken. Auch Uli Girreser gilt mein Dank für die Organisation des vierten Semesters und die Einarbeitung in die von mir betreuten Praktikumsversuche. Dirk und Kalle danke ich für ihre heldenhaften Einsätzen mit so manchen Gerätschaften und Susanne möchte ich für ihre tolle Art und ihre wichtige organisatorische Arbeit danken. Mein Dank gilt auch Volkmar und Detlef für ihre Hilfe bei diversen IT-Problemchen. Ich danke darüber hinaus Allen, mit denen ich viele gute Momente in und abseits der Uni hatte. Alex Döbber, Boris Pinchuk, Malte Mäder, Philipp Hajek, Monja Rothert, Marie Wiechert, Jenny Schneider, Fredi Scharenberg, Lea Petersen, Holger Erler, Inken Flörkemeier, André Gollmack und Tineke Albers danke ich dabei besonders.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine Familie, die mich immer unterstützt hat und meiner Mama und meiner Schwester danke ich für die Korrektur meiner Arbeit, sogar über die Weihnachtstage.