
Wasser- und Protonenausschluss in Formiat-Nitrit-Transportern

Dissertation

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

vorgelegt von
Jana Dorothea Renate Schmidt
Kiel, 2022

Erster Gutachter: **Prof. Dr. Eric Beitz**
Zweiter Gutachter: **Prof. Dr. Markus Bleich**
Tag der mündlichen Prüfung: **27.09.2022**
Zum Druck genehmigt: **27.09.2022**

Für Renate und Wolfgang Rambow,
Oma und Opa Lübeck

We need to find an I am
Keeping one eye in the sky and
Trying to trust
That the song he's working on is gonna
Shelter us

Eurydice in *Hadestown*, von **Anaïs Mitchell**

Inhalt

Zusammenfassung	XI
English Abstract	XII
Allgemeinwissenschaftliche Zusammenfassung	XIII
Graphische Zusammenfassung (<i>graphical abstract</i>)	XIV
Abkürzungsverzeichnis	XV
1 Einleitung	1
1.1 Schwache Säuren im physiologischen Kontext	1
1.1.1 Kurzkettige Carbonsäuren	3
1.1.2 Salpetrige Säure	4
1.1.3 Schwefelwasserstoff	4
1.2 Formiat-Nitrit-Transporter leiten schwache Säuren über biologische Membranen	5
1.2.1 Die EcFocA-Struktur	7
1.2.2 Der FNT-Transport-Mechanismus	14
1.3 Zielsetzung	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Geräte	25
2.2 Chemikalien und Kits	26
2.3 Verbrauchsmaterialien	29
2.4 Kodierende DNA, Vektoren und Oligonukleotide	29
2.5 Zelllinien	31
2.6 Transformation und Lagerung von <i>E. coli</i>	32
2.7 Isolation und Sequenzierung von Plasmid-DNA	32
2.8 Zielgerichtete <i>in-vitro</i> Mutagenese	33
2.9 Transformation und Lagerung von <i>S. cerevisiae</i>	34
2.10 Membranproteinisolation aus <i>S. cerevisiae</i>	35
2.11 SDS-PAGE, Coomassiefärbung und <i>Western-Blot</i>	36
2.12 Mikroskopie	38
2.13 Bestimmung der Generationszeit von <i>S. cerevisiae</i> nach Transformation	38
2.14 Radio-Assay in der Hefe	39
2.14.1 Durchführung in der <i>batch</i> -Methode	40
2.14.2 Durchführung im 96- <i>well</i> -Platten-Format	41
2.15 Generierung von Protoplasten aus <i>S. cerevisiae</i>	42
2.16 <i>Stopped-Flow</i>-Assays	43

2.16.1	Schwell- und Schrumpf-Assay zur Wasserleitfähigkeit	43
2.16.2	Fluoreszenz-Assay zur Protonenleitfähigkeit	44
2.17	Methylamin-Assays	45
2.18	<i>In-silico</i>-Modellierungen und -Berechnungen	45
2.19	Alignment von Proteinsequenzen	47
2.20	Statistische Auswertung	47
3 	Ergebnisse	49
3.1	Bidirektionale Substratpassage durch konstriktionserweiterte FNT-Varianten bei pH 6,8	49
3.1.1	Erweiterung der exoplasmatischen Konstriktion	53
3.1.2	Erweiterung der zytoplasmatischen Konstriktion	57
3.1.3	Zusammenspiel beider Konstriktionen	57
3.1.4	Direktionalität der Substratpassage: Influx vs. Efflux	58
3.1.5	Effekt der Porenerweiterung auf das eukaryotische PfFNT	60
3.2	pH-abhängige Substratpassage durch FNT mit erweiterten Konstriktionen	61
3.3	Michaelis-Menten-Kinetik nach Konstriktionserweiterung	66
3.4	Arrhenius-Aktivierungsenergie nach Konstriktionserweiterung	69
3.4.1	Aktivierungsenergie bei pH 6,8	69
3.4.2	Aktivierungsenergie bei erhöhter Protonenkonzentration	71
3.5	Schwerwassereffekte auf die Substratpassage durch FNT	72
3.6	Erweiterung des Substratspektrums von EcFocA-Varianten durch Konstriktionserweiterung	76
3.6.1	Wasserpassage durch EcFocA-Varianten nach Konstriktionserweiterung	77
3.6.2	Protonen-Passage durch EcFocA-Varianten nach Konstriktionserweiterung	83
3.6.3	Passage von neutralem Methylamin durch EcFocA-Varianten nach Konstriktionserweiterung	85
3.6.4	Passage von protoniertem Methylamin durch EcFocA-Varianten nach Konstriktionserweiterung	89
3.6.5	Glycerol-Passage durch EcFocA-Varianten nach Konstriktionserweiterung	93
4 	Diskussion	94
4.1	Evaluation des Hefe-Testsystems	94
4.2	Die FNT-Konstriktionen haben eine ratendiskriminierende Funktion	95
4.3	Die Richtung der Substratpassage durch FNT ist nicht durch die Konstriktionen bedingt	96
4.4	Die pH-abhängige Substratpassage durch FNT ist nur mit hydrophoben Konstriktionen möglich	99
4.5	Die Eröffnung der FNT-Konstriktionen führt zur Protonierung des zentralen Histidins	102
4.5.1	Die Substrataffinität der FNT ändert sich nicht mit eröffneter Konstriktion	103
4.5.2	Die Aktivierungsenergie der FNT steigt durch Konstriktionserweiterung	104

4.5.3	<i>In-silico</i> -Modellierungen bestätigen ein protoniertes Histidin bei eröffneter Konstriktion	106
4.6	Die Anionenselektivität der FNT ist durch die Konstriktionen gegeben	109
4.6.1	Ein FNT kann durch die Erweiterung der Konstriktionen in einen aquaporinähnlichen Wasserkanal umgewandelt werden	110
4.6.2	Ein konstriktionserweitertes EcFocA leitet Protonen	113
4.6.3	Sind die FNT-Konstriktionen ein unspezifischer Neutralteilchen und Kationenfilter?	114
4.7	Die hydrophoben Konstriktionen bedingen und ergänzen den <i>dielectric-slide</i>-Mechanismus	117
4.7.1	Die Substratprotonierung erfolgt nicht durch das zentrale Histidin	117
4.7.2	Das Zusammenspiel der hydrophoben Konstriktionen und dem zentralen Histidin in FNT	119
5	 Literatur	123
6	 Anhang	135
6.1	Kalium-Passage durch EcFocA-Varianten nach Konstriktionserweiterung	135
6.2	Ammonium-Passage durch EcFocA-Varianten nach Konstriktionserweiterung	139
	Eidesstattliche Erklärung	141
	Danksagung	142

Zusammenfassung

Formiat-Nitrit-Transporter (FNT) sind überwiegend in Proteobakterien und anderen einzelligen Organismen vorkommende Membranproteine, die bidirektional schwache Säuren leiten. Sie bilden aus Protomeren mit je sechs alpha-helikalen Transmembranspannen Homopentamere, die so fünf voneinander unabhängige Transportporen aufweisen. Jede davon ist durch dieselben hoch-konservierten Aminosäuren geformt, wobei die markanteste ein zentral gelegenes Histidin zwischen zwei ebenfalls hoch-konservierten Konstriktionen aus je drei hydrophoben Aminosäuren ist.

In der Literatur finden sich drei postulierte Hypothesen über den Mechanismus der Substratpassage durch FNT. Der *proton-relay*-Mechanismus beinhaltet ein protoniertes Histidin, wohingegen der *dielectric-slide*-Mechanismus ein konstant neutrales Histidin beschreibt und neuere *in-vivo*-Studien postulieren ein nur beim Substratimport protoniertes Histidin. Der größte Disput in der Literatur kommt demnach dem zentralen Histidin und dessen Protonierungszustand zu. Zudem schreibt keiner der Mechanismen den konservierten hydrophoben Konstriktionen eine Beteiligung am Transportmechanismus zu.

Durch zielgerichtete *in-vitro* Mutagenese und heterologe Expression in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde mit dieser Arbeit die Rolle der Konstriktionen und des zentralen Histidins mit Hilfe von Substrataufnahmeassays erforscht. Erhebungen zur Transportrate, pH-Kopplung der Substratpassage, Substrataffinität, Aktivierungsenergie, zu Schwerwassereffekten und zur Änderung des endogenen Substratspektrums nach Modulation der Konstriktionen von zwei FNT (EcFocA und PfFNT) ordnen den Konstriktionen eine direkte Funktion als Filterregion zu. Sie bedingen den Ausschluss von Wasser, kleinen neutralen Soluten, und Protonen. Da durch die Eröffnung der Konstriktionen die Protonierungswahrscheinlichkeit des zentralen Histidins erhöht wurde und dies die endogene Substratpassage zu unterbinden schien, suggerieren die Ergebnisse zusätzlich ein konstant neutrales Histidin während der endogenen Substratpassage.

Diese Arbeit identifiziert so erstmalig die Kationen- und Neutralteilchenbarriere in FNT und erklärt ihre Anionenselektivität für schwache Säuren. Sie stützt ebenfalls den *dielectric-slide*-Transport-Mechanismus.

English Abstract

Formate-Nitrite-Transporters (FNT) are membrane proteins facilitating bidirectional membrane passage of weak acids. They only occur in unicellular organisms, mostly in proteobacteria. They form homopentamers with each protomer forming one substrate transport pore out of six alpha-helical transmembrane domains. Each pore is formed by the same highly conserved amino acids, of which the most prominent is a central histidine sandwiched by two highly conserved constrictions formed by three hydrophobic amino acids each.

Three different hypotheses on how the substrates pass an FNT are described in literature. The *proton relay* mechanism includes a protonated central histidine, the *dielectric slide* mechanism involves a constant neutral central histidine. Newer studies include a protonated histidine only for substrate import. Thus, the most dominant dispute is about the protonation state of the central histidine. Furthermore, none of these mechanisms assign a role to the constriction sites.

This work studied the function of the constriction sites and the protonation state of the central histidine of FNT via site-directed *in-vitro* mutagenesis and heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* yeast using substrate-uptake assays. Explorations of transport rates, pH-coupling of substrate passage, substrate affinities, activation energies, heavy water effects and changes in the substrate spectrum after modulation of the constriction sites in two FNT (EcFocA and PfFNT) debunk them as a filter region. The constriction sites ensure the exclusion of water, small neutral solutes and protons. Concomitantly, the results suggest a constantly neutral histidine, as increasing its protonation probability by opening of the constrictions lead to self-impeding of the endogenous substrate passage.

This work as a first identifies a filter region for cation and neutral solutes in FNT and thereby explains anion selectivity for weak monovalent acids in FNT. It also supports the *dielectric slide* transport mechanism.

Allgemeinwissenschaftliche Zusammenfassung

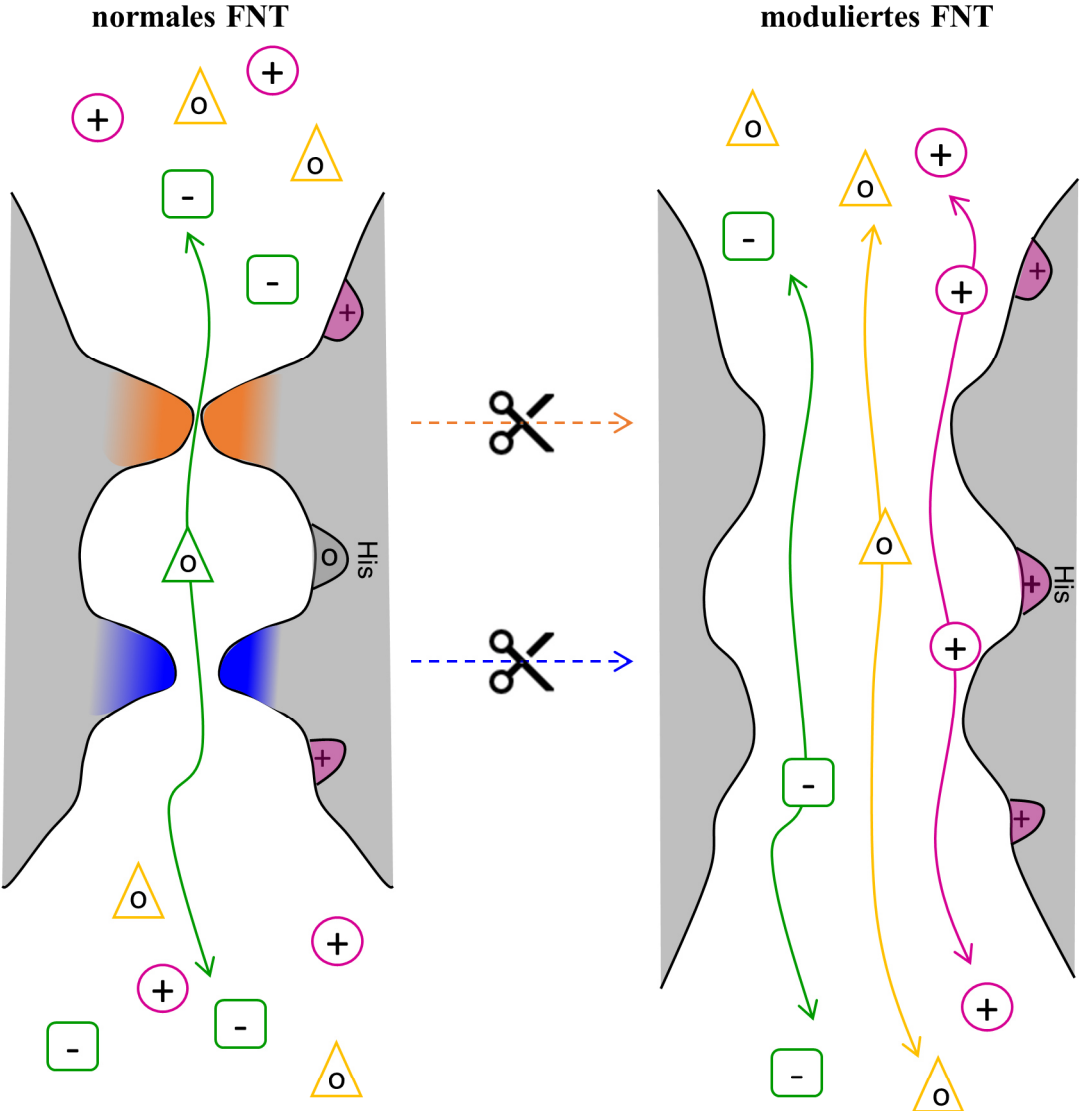
Formiat-Nitrit-Transporter (FNT) sind Tunnel in Zellmembranen von Bakterien und anderen Einzellern, die es kleinen Teilchen ermöglichen, Zellmembranen zu durchqueren. Die Teilchen, die die FNT in eine beliebige Richtung durchqueren (sogenannte Substrate) sind schwache Säuren wie Ameisensäure oder Milchsäure. FNT sehen aus wie ein fünfseitiges Prisma in welches fünf Tunnel gebohrt sind, durch die die Substrate wandern.

Vor Anfertigung dieser Arbeit gab es eine Meinungsverschiedenheit in den FNT-Fachkreisen: Man ist sich nicht einig, mit welchem Transportmechanismus die Substrate durch die Tunnel bewegt werden. Besonders umstritten ist hierbei der Zustand einer Aminosäure innerhalb des FNTs: dem zentralen Histidin. Manche sagen, es bindet ein Proton während die Substrate durch die Tunnel wandern, manche sagen, es tut es nicht, eine dritte Quelle sagt, das zentrale Histidin bindet das Proton nur, wenn die Substrate in die Zellen wandern. Dieses zentrale Histidin sitzt in der FNT-Pore zwischen sechs weiteren Aminosäuren, die den Tunnel dort verengen (das sieht man gut auf der Grafik auf der nächsten Seite). Von diesen sechs weiteren Aminosäuren war noch gar nicht bekannt, welche Rolle ihnen in den FNT zukommt – obwohl über 2200 FNT alle dieselben sechs Aminosäuren um das zentrale Histidin verbaut haben.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Experimente mit zwei FNT durchgeführt und so die unbekannte Rolle der Engstellen entschlüsselt: Sie sorgen dafür, dass nur die Substrate und keine anderen Teilchen, wie Wasser oder Proton, durch den Tunnel können. Es wurden damit auch mehrere Belege dafür gefunden, dass das zentrale Histidin während der Substratpassage neutral bleiben muss und kein Proton bindet.

Es wurde so erstmalig die Filterregion charakterisiert, die entscheidet, dass nur schwache Säuren durch die FNT hindurchkommen. Es wurde gezeigt, wieso Wasser und Protonen nicht durch die FNT wandern, deshalb trägt diese Arbeit den Titel „Wasser- und Protonenausschluss in Formiat-Nitrit-Transportern“. Es wurde mit dieser Arbeit ebenfalls ein Beitrag geleistet, um die Meinungsverschiedenheit um das zentrale Histidin in der Fachwelt zu klären.

Graphische Zusammenfassung (*graphical abstract*)



Normalerweise wandern nur negativ geladene Teilchen (grün) durch die FNT-Pore (grau), die durch zwei Engstellen (orange und blau) verjüngt wird und zwischen denen ein neutrales Histidin sitzt.

Entfernt man die Engstellen der FNT-Pore, wird das zentrale Histidin positiv geladen. Dann können auch neutrale und positiv geladene Teilchen durch die FNT-Pore.

Daraus lässt sich ableiten, dass die Engstellen das zentrale Histidin vor der Ladung schützen und damit neutrale und positive Teilchen an der Passage hindern.

Abkürzungsverzeichnis

6-FAM	Carboxyfluorescein
Amp	Ampicillin
AQP	Aquaporin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
D	Deuterium, ² H
D ₂ O	Deuteriumoxid
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate
DTT	Dithiothreitol
E _a	Arrhenius Aktivierungsenergie
FhIA	Formiat-Hydrogen-Lyase A
FNT	Formiat-Nitrit-Transporter
fw	<i>forward</i>
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HA-tag	Hämagglutinin-Anhang
His-tag	zehnfach-Histidin-Anhang
HRP	Meerrettichperoxidase
MD	<i>molecular dynamics</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)- propansulfonsäure
N	biologisches Replikat
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information, USA</i>

OD ₆₀₀	Absorption bei 600 nm
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	<i>Protein database</i>
PflB	Pyruvat-Formiat-Lyase B
pK _s	Säurestärke
pL	pH oder pD
PMF	protonenmotorische Kraft
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r.m.s.d	<i>root-mean-square deviation of atomic positions</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
rv	<i>reverse</i>
S.D.	Standardabweichung
S.E.M.	Standardfehler des Mittelwertes
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS- PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gel- Elektrophorese
SEIE	<i>Solvent equilibrium isotope effect</i>
SKIE	<i>Solvent kinetic isotope effect</i>
T	Temperatur
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethan-1,2- diamin
UTP	Uridin-5'-triphosphat
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>

1 | Einleitung

1.1 Schwache Säuren im physiologischen Kontext

Die klassische Brönsted-Säure-Basen-Theorie von 1923 besagt, dass eine Säure als Protonen-Donor agiert (Brönsted, 1923). Demnach können Protonen-Donoren wie Salzsäure, Schwefelsäure oder Salpetersäure als klassische, starke Säuren klassifiziert werden, da sie unter jeder Bedingung in wässriger Lösung deprotonieren und so als Brönsted-Säure agieren.

Etwas weniger eindeutig ist diese Zuordnung zur Säure bei den sogenannten schwachen oder auch als mittelstark bezeichneten Säuren. Diese reagieren, abhängig von der bereits vorhandenen Protonenkonzentration im wässrigen System, unterschiedlich (Mortimer und Müller, 2019). So zeigen schwache Säuren in einer Lösung von pH 7 eine nahezu komplette Deprotonierung, jedoch nimmt dieser Anteil mit steigender Protonenkonzentration im Medium ab. So entstehen für schwache Säuren pH-abhängige Deprotonierungskurven mit sigmoidalem Verlauf (Abbildung 1-1). Ob eine Säure protoniert oder deprotoniert vorliegt, hängt von der Säurestärke (pK_s -Wert) der betrachteten Verbindung ab. Für schwache Säuren liegt der pK_s -Wert grob über 3,5, für starke Säuren darunter. Wenn der pH dem pK_s entspricht, liegt die Hälfte der Säuremoleküle deprotoniert vor (Abbildung 1-1).

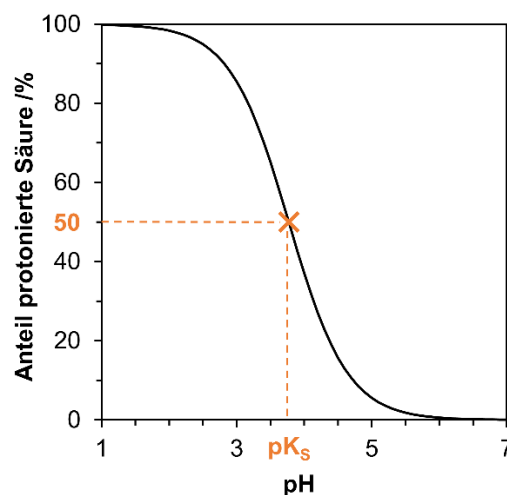


Abbildung 1-1: pH-abhängige Deprotonierungskurve einer schwachen Säure mit pK_s über 3,5. Wenn der pH-Wert dem pK_s -Wert entspricht, sind genau 50 % der Säuremoleküle in Lösung deprotoniert (orange).

Beispiele für schwache Säuren sind etwa Milchsäure, Essigsäure, Ameisensäure, Kohlensäure, salpetrige Säure, Schwefelwasserstoff oder auch Ammonium. Dies sind alles Verbindungen, die in physiologischen Systemen

Einleitung

Schwache Säuren im physiologischen Kontext

jeglicher Art vorkommen, da sie als Stoffwechselendprodukte anfallen oder als Energielieferanten metabolisiert werden können. Da jedoch die physiologischen pH-Werte nicht ständig konstant oder ubiquitär gleich sind, schwanken ihre Protonierungszustände im physiologischen Kontext. So können sie, je nach pH, entweder als Protonen-Donoren oder -akzeptoren wirken.

Das externe pH-Optimum für das Wachstum von Zellen schwankt stark zwischen Werten von bis zu 1 für extrem acidophile Bakterien (Malik und Hedrich, 2021) bis hin zu pH 11 für sehr alkaliphile Organismen (Horikoshi, 2011).

Der zytosolische pH-Wert ist in gesunden Zellen hingegen auf das jeweilige Optimum gepuffert, d.h. der pH-Wert ist stabilisiert und kann Änderungen der Protonenkonzentration abfangen (Boron, 2004; Poznanski *et al.*, 2013). Dieser physiologische intrazelluläre pH-Bereich umfasst hierbei deutlich engere Grenzen von ca. 5-8 (Padan und Schuldiner, 1987, Madshus, 1988). Das zytosolische Optimum für das alkaliphile Bakterium *Clostridium paradoxum* liegt beispielsweise trotz eines externen pHs über 9 bei 7,8 (Cook *et al.*, 1996).

So unterliegen schwache Säuren und Basen im physiologischen Kontext, vor allem bei der Passage einer Zellmembran ggf. großen Änderungen, wenn sie vom Protonen-Donor zum Protonenakzeptor werden. Dies äußert sich neben der Affinität zu Protonen auch in der Ladung des Stoffes, so dass etwa Anionen entstehen oder neutralisiert werden. Dieser Effekt des Wandels der chemischen Eigenschaften (*shape-shifting*) ist ein fundamentales Prinzip, welches bei der Beobachtung von schwachen Säuren im physiologischen Kontext berücksichtigt werden muss, und bei dem exakt zu unterscheiden gilt, ob das Anion oder die protonierte Säure der eigentliche Reaktionspartner ist (Bader und Beitz, 2020).

Die meisten dieser einleitend beschriebenen, physiologisch relevanten schwachen Säuren fallen als Stoffwechselendprodukte unterschiedlicher Wege der anaeroben Energiegewinnung an (Schlegel *et al.*, 2007). Diese treten überwiegend in Bakterien auf, sind aber teilweise auch in komplexeren Organismen bis hin zum Menschen zu finden. Physiologisch relevante schwache Säuren sollen hier näher erläutert und ihr natürliches Vorkommen anhand eines Beispiels exemplarisch beschrieben werden.

1.1.1 Kurzkettige Carbonsäuren

Die Ameisensäure ist das Endprodukt der Ameisensäuregärung, die durch den anaeroben Abbau von Zuckern in vielen Bakterien fakultativ der Energiegewinnung dient (Schlegel *et al.*, 2007). Ameisensäure deprotoniert unter den zytosolischen pH-Bedingungen mit einem pK_s -Wert von 3,77 (Williams, 2022) zum Formiat (Abbildung 1-2), welches für anaerob wachsende Mikroorganismen eine überschüssige reduzierende Komponente darstellt, die meist ausgeschleust wird. Jedoch kann Formiat mit einem Redox-Potential von ca. -420 mV auch als Energiequelle dienen und weiter zu Wasserstoff und Sauerstoff abgebaut werden (Li *et al.*, 2018).

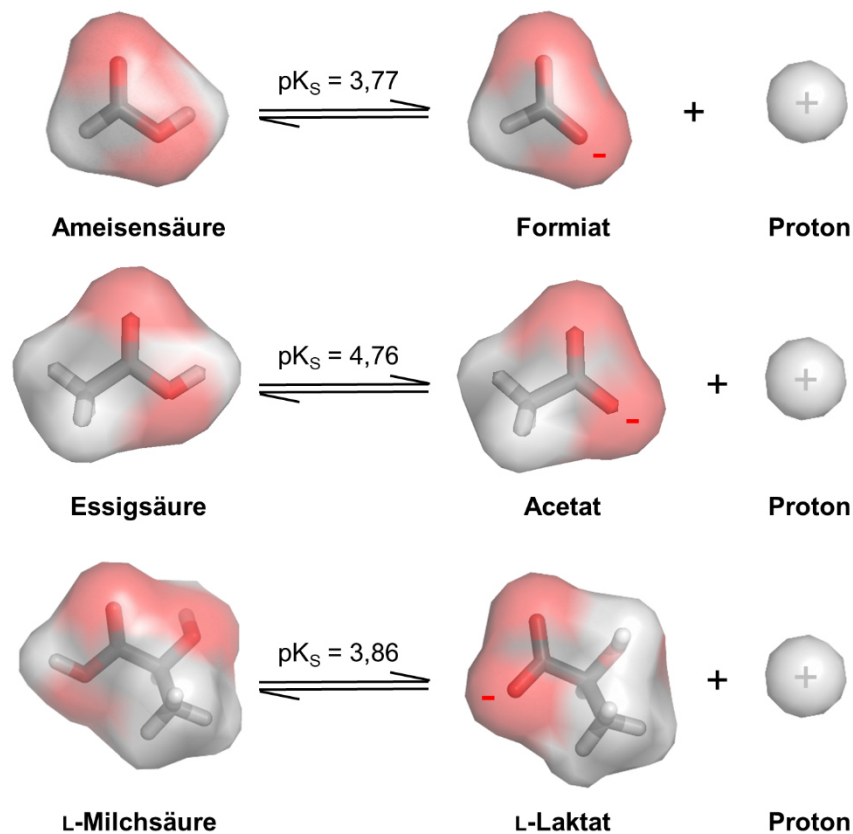


Abbildung 1-2: Deprotonierungsreaktion von Ameisensäure zu Formiat, Essigsäure zu Acetat und L-Milchsäure zu L-Laktat. Kohlenstoff grau, Wasserstoff weiß, Sauerstoff rot. Die halbtransparente Hülle stellt die Connolly-Oberfläche dar.

Dieser Prozess soll gleichzeitig der Azidifizierung des Zytosols durch Formiat entgegenwirken. So muss in Organismen, die Formiat produzieren oder dieses verstoffwechseln, eine feine Regulation für die intrazelluläre Formiat-Konzentration gegeben sein. Ein Beispiel hierfür sind Enterobakterien wie das *Escherichia coli*, welches in anaeroben Phasen durch gemischte Säuregärung viel Formiat produziert und ausscheidet (Belaich und Belaich, 1976). Beim Absinken des

Einleitung

Schwache Säuren im physiologischen Kontext

externen pH-Milieus nimmt es Formiat wieder auf und setzt es zu Wasserstoff und CO₂ um (Suppmann und Sawers, 1994). Aus der gemischten Säuregärung fällt in *E. coli* zusätzlich Milchsäure (pK_s = 3,86; Williams, 2022) und Essigsäure (pK_s = 4,76; Williams, 2022) an. Beides sind ebenfalls schwache Säuren, die unter den physiologischen Bedingungen in der deprotonierten Form als L-Laktat und Acetat vorliegen, und entweder weiter verstoffwechselt oder ausgeschieden werden (Abbildung 1-2; Schlegel *et al.*, 2007).

1.1.2 Salpetrige Säure

Nitrit bildet das deprotonierte Anion der Salpetrigen Säure (Abbildung 1-3). Diese stellt mit einem pK_s-Wert von 3,29 ebenfalls eine schwache Säure dar (Holleman *et al.*, 2019). Nitrit gehört zu den Schlüsselverbindungen der Stickoxide im Stickstoffkreislauf. Es fällt hierbei vor allem bei der ersten Stufe der Nitrifikation durch aerobe Ammoniak-Oxidation durch Nitritbakterien an (Cole, 1996). In anderen Organismen, wie *E. coli* wird es hingegen zum Ammoniak reduziert (Simon, 2002). So stellt Nitrit eine wichtige Redox-Komponente für die Stickstoffassimilation dar, die gleichzeitig eine Auswirkung auf das Säure-Base-Gleichgewicht der Zellen hat.

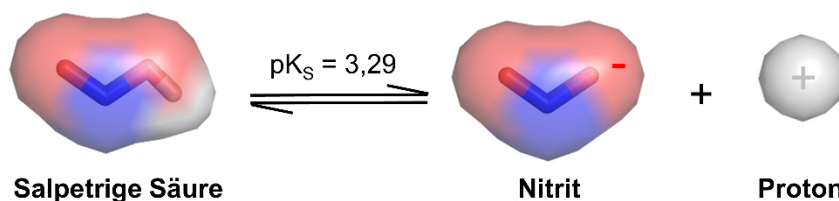


Abbildung 1-3: Deprotonierungsreaktion von Salpetriger Säure zu Nitrit. Stickstoff blau, Wasserstoff weiß, Sauerstoff rot. Die halbtransparente Hülle stellt die Connolly-Oberfläche dar.

1.1.3 Schwefelwasserstoff

Schwefelwasserstoff ist ein gasförmiger biologischer Botenstoff (Kimura, 2014), welcher sowohl physiologische als auch pathophysiologische Effekte auslöst und steuert (Borisov und Forte, 2021). So dient es in geringen Mengen als Auslöser für biologisch relevante Prozesse, wie etwa der Reduktion von Disulfidbrücken (Murphy *et al.*, 2019) oder der Stimulation einer ATP-Synthase in Säuger-Mitochondrien (Módis *et al.*, 2016). Bei erhöhter Konzentration wirkt es jedoch zytotoxisch und muss abgebaut oder aus Zellen entfernt werden (Borisov und Forte, 2021). Mit einem pK_s von ca. 7 (Li und Lancaster, 2013) liegt es unter

Einleitung

Formiat-Nitrit-Transporter leiten schwache Säuren über biologische Membranen

physiologischen Bedingungen demnach in etwa zur Hälfte anionisch und zur anderen Hälfte neutral vor.

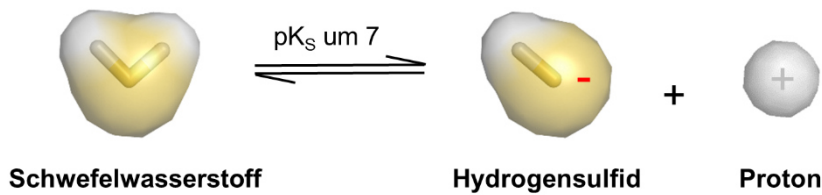


Abbildung 1-4: Deprotonierungsreaktion von Schwefelwasserstoff zu Hydrogensulfid. Schwefel gelb, Wasserstoff weiß, Sauerstoff rot. Die halbdurchsichtige Hülle stellt die Connolly-Oberfläche dar.

1.2 Formiat-Nitrit-Transporter leiten schwache Säuren über biologische Membranen

Da schwache Säuren unter den physiologisch-zytosolischen pH-Bedingungen in großen Teilen als Anionen vorliegen, sind sie in dieser deprotonierten Form nur mäßig membrangängig. Von den zuvor genannten schwachen Säuren können lediglich Acetat und Formiat in kleinen Mengen auch ohne einen spezifischen Kanal oder Transporter die Zellmembranen passieren (Hanneschlaeger *et al.*, 2019). Es bedarf also membranständiger Kanäle, Transporter oder *Shuttle*-Systeme, um die Homöostase der Verbindungen und damit gekoppelt auch den zellulären Säure-Base- und Energie-Haushalt in den Organismen, die die schwachen Säuren produzieren und metabolisieren, aufrechtzuerhalten.

1994 wurde erstmalig postuliert, dass das Genprodukt des *focA* aus *E. coli* an der Regulation der intrazellulären Formiat-Konzentration beteiligt ist. Das sogenannte FocA (für *formate channel A*) sollte Hydrophobizität-Plots nach einem spezifischen, bidirektionalen Kanal mit sechs Transmembranspannen (TM) ausbilden. Erste Experimente zeigten ebenfalls eine durch die Formiat-Konzentration regulierte Expression. Eine zu beobachtende Schwefelwasserstoff Resistenz bei Mutation des *focA* indizierte zudem, dass auch Formiat-Analoga durch den postulierten Kanal geleitet werden können (Suppmann und Sawers, 1994). Zwei weitere bis dato bekannte Proteinsequenzen, die des FdhC (für *Formiat Dehydrogenase C*) aus *Methanobacterium formicicum* (White und Ferry, 1992) und die des NirC (für *Nitrite channel C*) aus *E. coli* (Peakman *et al.*, 1990) konnten bald als Sequenzanaloga zugeordnet werden. Deren Funktionen waren bis dahin unbekannt, lediglich ein Zusammenspiel für die Expressionsregulation von FdhC und der Formiatkonzentration bereits beschreiben. Später konnte dem

Einleitung

Formiat-Nitrit-Transporter leiten schwache Säuren über biologische Membranen

NirC eine Funktion als Nitrit-Transporter zugeschrieben werden (Clegg *et al.*, 2002).

Tabelle 1: Gruppierung der acht Subtypen der FNT-Proteine in Formiat-, Nitrit-, Hydrogensulfid-Kanäle und das YfdC-Cluster. Angaben entnommen aus: Mukherjee *et al.*, 2017.

Formiat-Kanäle

Subtypen	FocA, FdhC
präferiertes Substrat	Ameisensäure
weitere Gemeinsamkeiten	Gen liegt im <i>pfl</i> -Operon, wird stets coexprimiert
Anteil an FNT	ca. 32 %

Nitrit-Kanäle

Subtypen	NirC α , NirC β , NirCy
präferiertes Substrat	Salpetrige Säure
weitere Gemeinsamkeiten	wird meist mit Nitrit-Reduktase exprimiert
Anteil an FNT	ca. 27 %

Hydrogensulfid-Kanäle

Subtypen	HSC
präferiertes Substrat	Schwefelwasserstoff
weitere Gemeinsamkeiten	einige sind mit dem <i>asrABC</i> -Operon reguliert
Anteil an FNT	ca. 15 %

YfdC-Cluster

Subtypen	YfdC α , YfdC β
präferiertes Substrat	unbekannt; auch kationische Substrate denkbar (Mukherjee <i>et al.</i> , 2020)
weitere Gemeinsamkeiten	engste Konstruktionen innerhalb der FNT-Familie
Anteil an FNT	ca. 27 %

2005 fällt in der Literatur schließlich erstmals der Begriff der Formiat-Nitrit-Transporter (FNT) (Larsson *et al.*, 2005), welcher durch Vergleich mit den bis 2010 bekannten Sequenzen dann die Proteinklasse der FNT begründet (Falke *et al.*, 2010). Inzwischen sind über 2200 FNT-Vertreter beschrieben. Das Vorkommen erstreckt sich hierbei weitestgehend über die Bakterien, wobei die Proteobakterien hier den größten Anteil vor den Firmicuten und Actinobakterien ausmachen. Nur etwa 15 % aller FNT finden sich in Archaeen und Eukaryoten und diese sind dabei limitiert auf Fungi, Alveolata, Vividriplantae und wenige andere einzellige Lebewesen. Mehrzellige Organismen weisen keine FNT-Analoga auf, sondern bewerkstelligen die spezifische Membranpassage von schwachen Säuren über andere Kanal- und Transportproteine (Mukherjee *et al.*, 2017).

Einleitung

Die FNT-Familie wurde zunächst in drei Subgruppen unterteilt (Falke *et al.*, 2010); nach neusten Analysen umfasst sie acht (Mukherjee *et al.*, 2017). Diese wurden wiederum zusammengefasst in vier Klassen: Formiat-, Nitrit- und Hydrogensulfid-Kanäle sowie das YfdC-Cluster (Tabelle 1).

1.2.1 Die EcFocA-Struktur

15 Jahre nach seiner Entdeckung konnte die Struktur des *focA* Genproduktes mittels Röntgenkristallographie aufgeklärt werden (Wang *et al.*, 2009).

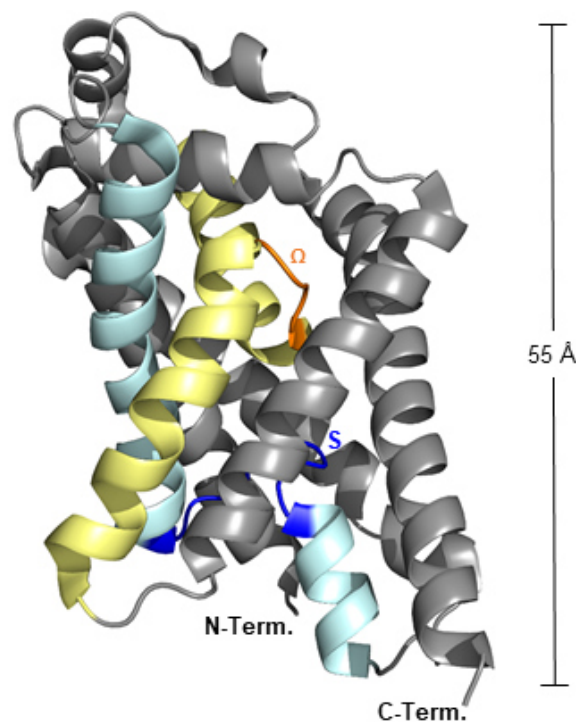


Abbildung 1-5: Darstellung eines EcFocA-Monomers in der *Cartoon*-Darstellung. Sechs α -Helices winden sich zu einem Protomer mit innerer Pore umeinander. TM2 (gelb) und TM5 (hellblau) sind von den *signature loops* Ω (orange) und S (dunkelblau) unterbrochen. Die Termini sind nicht mit aufgelöst, aber angezeigt und liegen zytoplasmatisch.

Betrachtet man von dieser Struktur zunächst ein EcFocA-Protomer, so zeigen sich die sechs postulierten α -Helices, die sich rechtsläufig umeinanderwinden, und so eine Pore ausformen. Von außen auf dieses Bündel geschaut, ergibt sich eine Sanduhr-Form. Beide Termini des Proteins liegen auf derselben Seite, *in-vivo* entspricht dies der zytoplasmatischen. Die einzelnen α -Helices sind durch kurze, *loop*-Regionen verbunden, zwei der Helices sind außerdem durch je eine *loop*-Region (sog. *signature-loops*, Ω in TM2 und S in TM5) unterbrochen (Abbildung 1-5).

Die zur Zellmembran orthogonale Pore ist aus einer Mischung von geladenen und hydrophoben Aminosäuren ausgekleidet und zeigt so einen amphipathischen Charakter. In den beiden Vestibülen finden sich einzelne geladene Aminosäuren,

Einleitung

Formiat-Nitrit-Transporter leiten schwache Säuren über biologische Membranen

die über die FNT-Familie konserviert sind (Wang *et al.*, 2009; Mukherjee *et al.*, 2017). Es ergibt sich eine quasi-Symmetrieachse in der Ebene der Lipidmembran und der N-terminale Teil bis TM3 wiederholt sich strukturell von TM4 bis TM6 im C-terminalen Teil des Proteins.

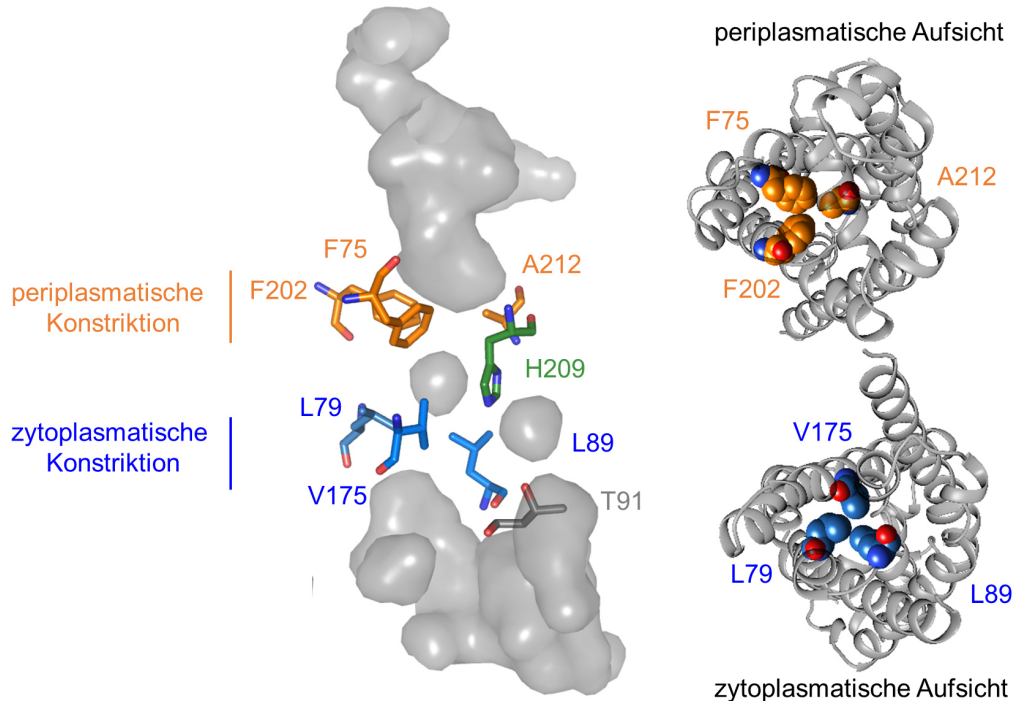


Abbildung 1-6: Der Verlauf der EcFocA-Transportpore zeigt sich als lösungsmittelzugänglicher Raum (grau), welcher durch zwei Konstriktionen (periplasmatisch, orange: F75, F202, A212; zyttoplasmatisch, blau: L79, L89, V175) beschränkt wird. Dazwischen sitzt ein konserviertes Histidin (H209, grün), zyttoplasmatisch vergraben ein konserviertes Threonin (T91, grau). Rechts: Aufsicht von periplasmatischer oder zytoplasmatischer Seite (Sekundärstruktur grau). Man sieht in der *sphere*-Darstellung die Verjüngung durch die jeweilige Konstriktion.

Die Kernporenregion ($< 3,5 \text{ \AA}$ Durchmesser) zwischen den Vestibülen ist nur 15 \AA lang, rein hydrophob und verjüngt sich zweimal. Auf exoplasmatischer Seite bildet sich die erste Verjüngung auf einen Durchmesser von $1,8 \text{ \AA}$ durch zwei hochkonservierte Phenylalanine (F75, F202) und ein Alanin (A212). $7,5 \text{ \AA}$ weiter entlang der Pore ergibt sich eine zweite, zyttoplasmatische Konstriktion mit einem Durchmesser von $1,35 \text{ \AA}$, welche die engste Stelle der EcFocA-Pore darstellt. Sie wird von zwei Leucinen (L79, L89) und einem Valin (V175) ausgebildet, die ebenfalls einen hohen Konservierungsgrad aufweisen. Aufgrund dessen, dass eine solch enge Pore für das beschriebene endogene Substrat Formiat/Ameisensäure zu klein wäre, wurde diese Struktur als geschlossener Zustand des Proteins angenommen, der sich bei Substratpassage öffnet.

Einleitung

Zwischen den beiden beschriebenen Konstriktionen befindet sich eine weitere hoch-konservierte Aminosäure, die in über 98 % aller bekannten FNT an dieser Stelle sitzt: Ein Histidin (H209). Es kann in zwei Konformationen („up“ und „down“ Position des Imidazolrings, Vergleich Briefumschlag und Halbsesselkonformation von Cyclopentan; Clayden *et al.*, 2017) vorliegen und ist rotationsbeweglich. Direkt darunter liegt ein im Kristall gebundenes Wassermolekül, welches wiederum in Wasserstoffbrücken-Bindungsnahe zu einem hochkonservierten Threonin (T91) steht. Dieses ragt nicht in die Pore hinein (Abbildung 1-6).

Fünf EcFocA-Protomere schließen sich durch hydrophobe Wechselwirkungen zu einem Pentamer zusammen, so dass ein FNT-Protein, wie postuliert (Falke *et al.*, 2010), stets aus fünf gleichen Transportpfaden aufgebaut ist. Durch die radiale Anordnung der Protomere ergibt sich eine sechste Pore in der Mitte (Abbildung 1-7). Diese ist im Kristall detergens-, in der Membran lipidgefüllt und stellt einen Verankerungspunkt des FNT in der Membran dar. Durch sie wird keines der endogenen Substrate geleitet. Das EcFocA-Pentamer spannt auf exo- und zytoplasmatischer Seite je eine Fläche von ca. 5000 Å² auf und besitzt eine fünfzahnige Symmetrieachse durch die mittige Membranverankerung. Die Oberflächenladung ist exoplasmatisch überwiegend negativ und zytoplasmatisch ausgeprägt positiv (Abbildung 1-7).

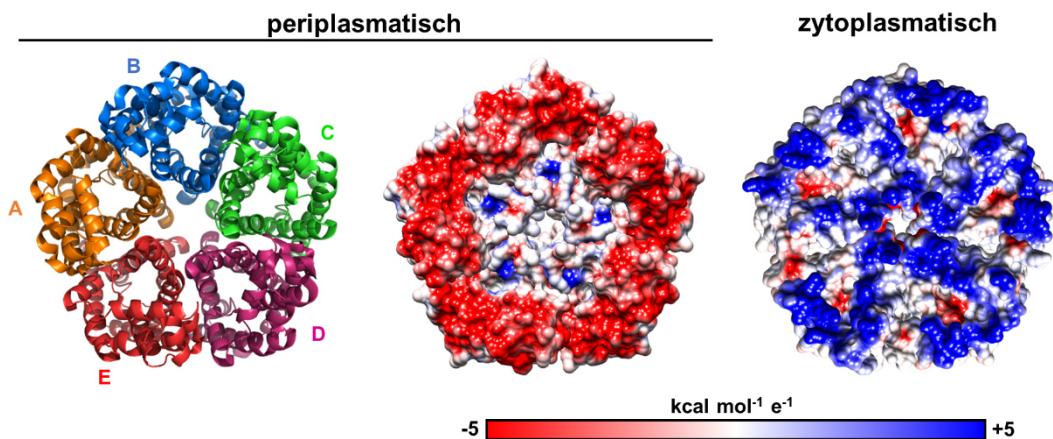


Abbildung 1-7: Links: Das EcFocA-Protomer lagert sich zyklisch zu einem Homopentamer (Ketten A-E) zusammen. In der Mitte bildet sich so eine lipidgefüllte Pore. Mitte und rechts: Das Coulomb-Oberflächenpotential ist periplasmatisch stark negativ mit einzelnen positiven Komponenten an den Poreneingängen und zytoplasmatisch überwiegend positiv geladen.

1.2.1.1 Strukturelle Ähnlichkeit der FNT zu den Aquaporinen

Mit der Aufklärung der EcFocA-Struktur fiel schnell die Ähnlichkeit des Protomers mit einem Aquaporin-(AQP)-Protomer auf. Beim strukturellen Alignment

Einleitung

des AQPs EcGlpF aus *E. coli* mit EcFocA wird dies besonders deutlich (Abbildung 1-8). In ihrer Sequenz unterscheiden sich AQP und FNT deutlich, und so überraschte diese Entdeckung der analogen Struktur (Wang *et al.*, 2009). Dies wird deshalb als konvergente Evolution bewertet und nicht als Entwicklung aus demselben ursprünglichen Gen. Zudem unterscheiden sie sich im Multimer, da AQP stets Tetramere ausbilden.

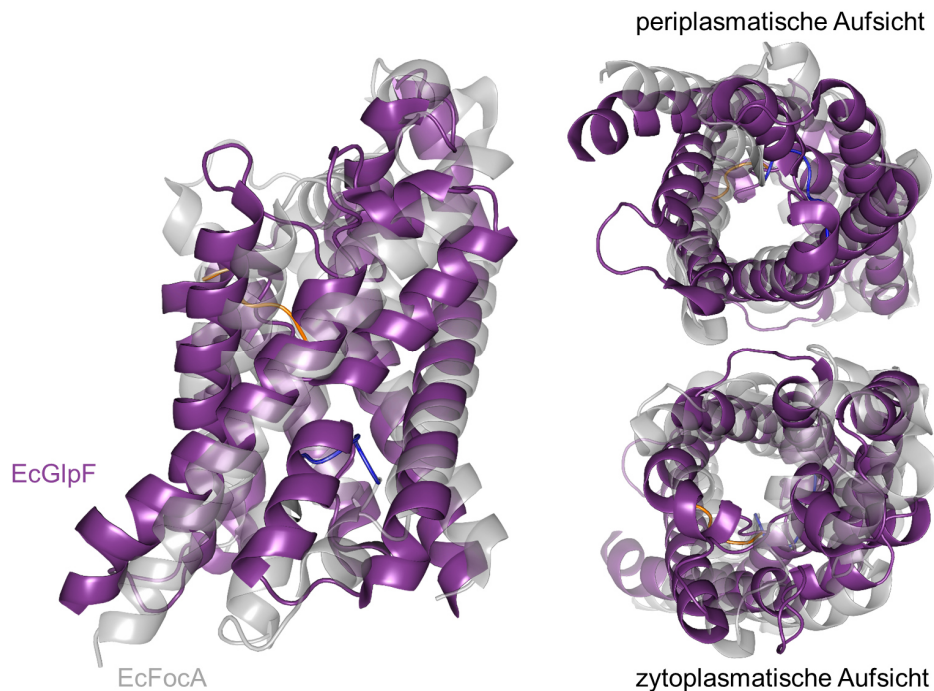


Abbildung 1-8: Die Protomere des *E. coli*-FNT FocA (grau-transparent, zytoplasmischer *loop* blau, exoplasmatischer *loop* orange) und -AQP GlpF (violett) lassen sich durch strukturelles Alignment fast deckungsgleich übereinanderlegen (r.m.s.d. = 3,2).

Das EcGlpF-Protomer zeigt ebenfalls sechs TM aus α -Helices, von denen zwei durch *loop*-Regionen unterbrochen sind. Auch in den AQP finden sich hochkonservierte Aminosäuren innerhalb der Pore. Diese tragen eine positive Ladung bzw. bilden ein positives elektrostatisches Feld, welches für den Ausschluss von Protonen und weiterer kationischer Substrate sorgt (Wu *et al.*, 2009; Eriksson *et al.*, 2013). Sie dienen somit als Selektivitätsfilter. Sie stellen zudem mit einem Durchmesser von 3 Å die engsten Stellen der AQP-Pore und damit Konstriktionen dar. Wegen der strukturellen Ähnlichkeit wurden für das EcFocA mechanistische Ähnlichkeiten zu den AQP vermutet. So gibt es auch monocarboxylatleitende AQP (AQP9: Tsukaguchi *et al.*, 1998; Tsukaguchi *et al.*, 1999; Rothert *et al.*, 2017, SmAQP: Faghiri und Skelly, 2009, TbAQP1-3: Uzcátegui *et al.*, 2018, NIP2;1: Wallace *et al.*, 2006; Choi und Roberts, 2007, LbGlpF4: Bienert *et al.*, 2013, AqpZ: Wang *et al.*, 2009), und sogar ein Nitrit leitendes AQP (AQP6: Yasui *et al.*, 1999),

welche hier das mechanistische Bindeglied zwischen den AQP und den FNT bilden könnten.

1.2.1.2 Die Struktur weiterer FNT

Inzwischen sind fünf verschiedene FNT-Strukturen aufgeklärt, die unter verschiedenen Bedingungen aufgelöst wurden und insgesamt siebzehn Einträge in der *protein database* (PDB) lieferten (EcFocA: Wang et al., 2009; VcFocA: Waight et al., 2010; StFocA; StNirC: Lü et al., 2011; CdHSC: Czyzewski und Wang, 2012; PfFNT: Lyu et al., 2021; Peng et al., 2021). Diese decken drei der FNT-Klassen (Tabelle 1) über einer pH-Spanne von 4,0 bis 9,0 ab. Einige Strukturen wurden dabei in Anwesenheit eines Substrats oder Inhibitors aufgelöst. Vom CdHSC wurden zusätzlich zum Wildtyp fünf Mutanten aufgelöst.

Ein Alignment der Aminosäure-Sequenzen der aufgeklärten FNT-Strukturen zeigt deutlich die hoch-konservierten Positionen der FNT (Abbildung 1-9).

Die konstriktionsbildenden Aminosäuren und das zentrale Histidin sind in allen sechs Sequenzen zu finden. Lediglich im FNT aus *Plasmodium falciparum*, PfFNT, ist an der EcFocA-Position L79 ein Phenylalanin zu finden. Zusätzlich zeigen sich über 20 weitere hochkonservierte Positionen (schwarz hinterlegt in Abbildung 1-9). Die Verbindung des Histidins und Threonins ist nicht in allen Strukturen über ein fixiertes Wassermolekül gegeben. Beispielsweise wird im VcFocA diese Verbindung auch direkt über eine Wasserstoff-Brückenbindung erreicht (Waight et al., 2010).

Einleitung

Formiat-Nitrit-Transporter leiten schwache Säuren über biologische Membranen

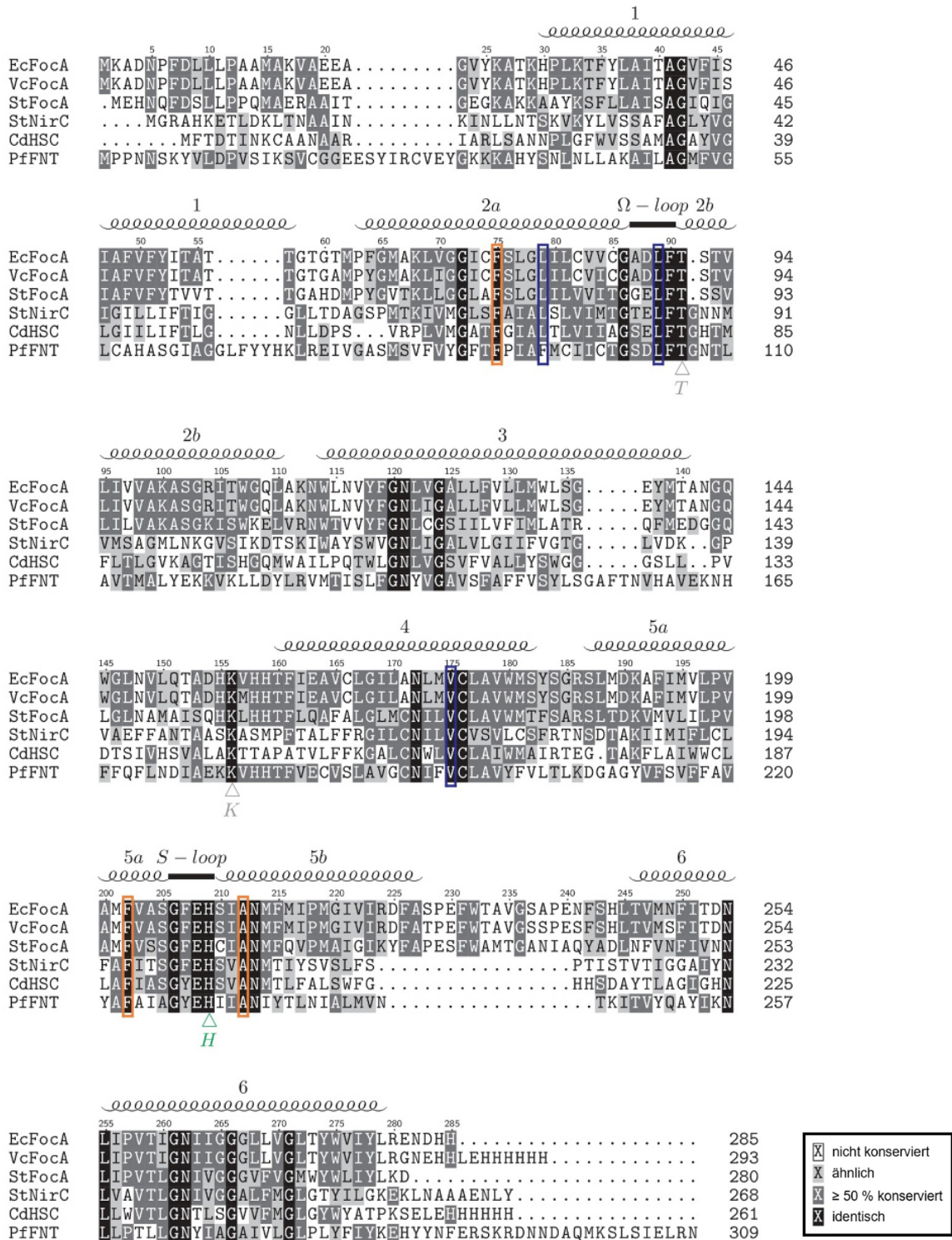


Abbildung 1-9: Alignment der Proteinsequenzen von FNT, deren Struktur aufgeklärt wurde. Die Intensität der grauen Schattierung gibt den Konservierungsgrad der Aminosäuren wieder (siehe Box rechts). Blau umrahmt sind Aminosäuren der exoplasmatischen, orange umrahmt die der zytoplasmatischen Konstriktion. Das hochkonservierte Histidin (grün), und Threonin (grau) sind mit Dreiecken angezeigt.

Strukturen, bei denen das Substrat zum Kristallisationsansatz gegeben wurde, zeigten trotz Anwesenheit dessen keine merkliche Veränderung der bekannten Struktur und ließen so erstmalig vermuten, dass es sich bei den FNT um klassische Kanäle und nicht um Transportproteine handelt, und somit keine

Einleitung

Konformationsänderung zur Substratpassage nötig ist (Waight *et al.*, 2010, siehe 1.2.2). Es wurde zudem ersichtlich, dass das Substrat seine Hydrathülle bei der Passage durch das FNT abstreift (Waight *et al.*, 2010).

Auch beim strukturellen Alignment (*superimposing*) der fünf Strukturen mit dem EcFocA, welches als „Prototyp“ und besterforschtes FNT gilt, ergeben sich kaum Unterschiede. Die Oberflächenpotentiale der bekannten Strukturen zeigten ebenfalls alle eine hohe Ähnlichkeit zum EcFocA mit zytoplasmatisch überwiegend positivem und peri- bzw. exoplasmatisch überwiegend negativem Potential mit einzelnen positiven Ladungen am Poreneingang (Abbildung 1-10). So zeigt sich neben der sequenziellen auch eine starke strukturelle Ähnlichkeit der FNT. Dies lässt auch vermuten, dass alle FNT einem ähnlichen Mechanismus folgen, da sie die gleichen Voraussetzungen zur Passage der schwachen Säuren haben. Lediglich in der Konformation des N-Terminus konnten in Abhängigkeit zum pH-Wert teilweise Änderungen gefunden werden. Der ersten These eines pH-indizierten *gatings* des FNT (Lü *et al.*, 2011) wurde aber inzwischen widersprochen, da der N-Terminus einerseits zu flexibel ist und die Pore andererseits nicht vollständig verschließen kann (Lv *et al.*, 2013). Wie und ob die Passage durch FNT stattdessen kontrolliert ist, ist unklar. Nur für das EcFocA wird ein (pH-unabhängiges) *gating* durch die Interaktion mit einem anderen Protein und dem N-Terminus beschrieben (Doberenz *et al.*, 2014; Kammel *et al.*, 2021).

Die FNT-Strukturen lieferten auch Modelle für Bindemodi von Inhibitoren der plasmodialen FNT (Lyu *et al.*, 2021; Peng *et al.*, 2021) und ließen Hypothesen für den Transportmechanismus aufstellen, von denen in der Literatur mehrere postuliert sind und diskutiert werden.

Einleitung

Formiat-Nitrit-Transporter leiten schwache Säuren über biologische Membranen

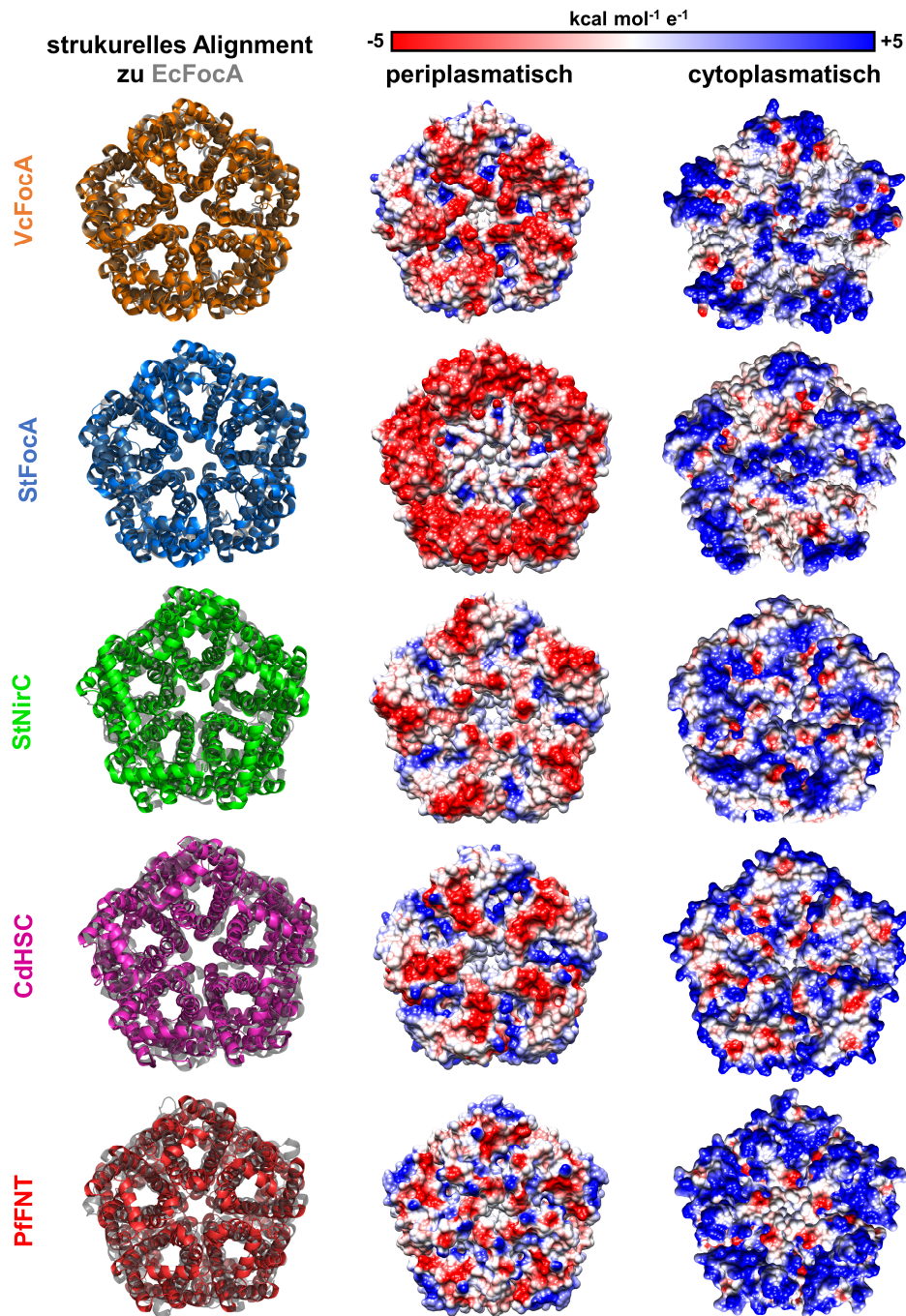


Abbildung 1-10: Links: Strukturelles Alignment der fünf weiteren FNT, deren Struktur neben dem EcFocA (grau transparent) aufgeklärt wurde (VcFocA (orange, PDB #3KLY, r.m.s.d = 0,65), StFocA (blau, PDB #3Q7K, r.m.s.d. = 0,34), StNirC (grün, PDB #4F4C, r.m.s.d. = 2,5), CdHSC (pink, PDB #3TDR, r.m.s.d. = 11), PfFNT (rot, PDB #7E26, r.m.s.d. = 30)). Mitte und rechts: jeweiliges peri- und zytoplasmatisches Coulomb Oberflächenpotential.

1.2.2 Der FNT-Transport-Mechanismus

Die Art und Weise, mit der FNT ihre Substrate durch die Membran befördern, war bei ihrer Entdeckung unklar. So ergab sich auch die widersprüchliche Benennung von FN-*Transportern* und den Subgruppen Formiat-, Nitrit- und Hydrogensulfid-Kanal (siehe Tabelle 1). Transporter und Kanäle sind in der

Einleitung

Literatur klar voneinander getrennte Proteinklassen, die sich durch Transportmechanismus, Aktivierungsenergie, Substrataffinitäten und Ratenkonstanten differenzieren lassen (Müller-Esterl, 2018). Die FNT weisen Eigenschaften beider Gruppen auf und lassen sich so nicht eindeutig zuordnen (Wiechert und Beitz, 2017b; Bader und Beitz, 2020). Zudem wurde der Begriff FNT vor Messung der genannten Eigenschaften etabliert, als nicht feststand, um welche Klasse von Proteinen es sich handelt. So ist die präziseste Beschreibung der FNT ein Hybrid der beiden Proteinklassen, das Eigenschaften beider Gruppen aufweist.

Bei der Aufklärung des Transportmechanismus von FNT galt es zunächst die Frage zu klären, ob die anionische, deprotonierte oder die neutrale, protonierte Säure oder gar ein Proton und ein Anion gemeinsam, aber nicht verbunden, im Sinne eines Co-Transportes, durch die FNT-Pore geleitet wird (1.1).

Erste elektrophysiologische Untersuchungen zeigten, dass ein Stromfluss über StFocA bestückte Lipidmembranen versagt, sobald Salzsäure dem externen Medium zugegeben wird. Erst nach erneutem Alkalisieren stellte sich ein messbares Signal wieder ein (Lü *et al.*, 2011). So wurde postuliert, dass das Anion geleitet wird und es ein pH-sensitives *gating* der FNT geben muss. Dies wurde auch durch die physiologische Rolle vom FocA und NirC begründet, die je nach Wachstumsbedingungen der Enterobakterien Formiat/Ameisensäure und Nitrit/Salpetrige Säure aufnehmen oder abgeben und die Direktionalität der Substratpassage so durch den pH vorgegeben ist (1.1.1, 1.1.2).

Experimente am StNirC zeigten in Proteoliposomen, jedoch die parallele Passage von Formiat und Proton an (Rycovska *et al.*, 2012). Spätere Experimente am StNirC zeigten über einen pH von 4,0-7,9 keine wesentlichen Unterschiede in elektrophysiologischen Experimenten und widersprachen damit einem pH-sensitiven *gating* (Lü *et al.*, 2012b). Es wurde daraufhin das erste Mal vorgeschlagen, dass ein Proton intern das FNT-Protomer periodisch durchläuft (*internal proton cycling*) aber nicht mit auf die andere Seite der Zellmembran befördert wird, sondern das Substrat nur kurzzeitig für die Passage durch die hydrophobe Pore neutralisiert. Zudem wurde hervorgehoben, dass die aufgelösten FNT-Strukturen nicht, wie zunächst angenommen, eine geschlossene Struktur des Proteins darstellen, sondern dass es den porenformenden Aminosäuren durch die *signature loops* und deren Flexibilität möglich ist, sich so zu bewegen, dass

Einleitung

Substrate, trotz der Enge der Konstriktionen, passieren können (sogenanntes *flickering*; Lü *et al.*, 2012b).

Weitere Ansätze, um die Frage nach einer pH-Sensitivität der FNT zu klären, lagen etwa in einer Salzbrücke aus konservierten Leu-Glu-Asn-Resten im Protomer (Czyzewski und Wang, 2012) oder in einer Verbindung vom zentralen Histidin mit einem konservierten Asparagin (Feng *et al.*, 2012).

Experimente am StFocA (Lü *et al.*, 2012a) offenbarten durch elektrophysiologische Messungen schließlich, dass das FocA polyspezifisch für Anionen von schwachen Säuren ist und neben Formiat auch Nitrit, Lactat, Acetat, Hypophosphit und Pyruvat leiten kann. Selbst Chlorid-Ionen, das Anion der starken Säure Salzsäure, konnten das StFocA passieren. Jedoch war hier die Menge des geleiteten Substrates deutlich geringer und Chlorid wurde so als physiologisch nicht relevantes Substrat eingeordnet. Wie beim StNirC versagte die elektrogene Passage der anionischen Substrate ab pH 5,7. Auch hier wurde ein sogenannte *flickering*, also das schnelle Bewegen der porenformenden Aminosäureseitenketten, als notwendig für die Substratpassage beschrieben und indirekt über beobachtete Membranpotentiale abgeleitet (Lü *et al.*, 2012a). Dadurch, dass auch Neutralteilchen und bivalente Anionen nicht geleitet wurden, wurde zudem gefolgert, dass lediglich eine einfach-positiv geladene Aminosäure im FNT für die Selektion der monovalenten Anionen zuständig sei. Hierfür wurde das zentrale Histidin vorgeschlagen, da durch eine StFocA-H209F-Mutante keine Substratpassage mehr beobachtet werden konnte.

1.2.2.1 Der *proton-relay*-Mechanismus mit protoniertem Histidin

Ein *Review* von 2013 postulierte anhand der bis dahin bekannten Datenlage schließlich den ersten Transportmechanismus für die FNT (Lü *et al.*, 2013).

Die hydrophoben Konstriktionen stellen für das anionische Substrat eine energetische Barriere dar und so muss die unter physiologischen Bedingungen deprotonierte Säure neutralisiert werden, bevor sie die FNT-Pore passiert. Es wurde gefolgert, dass es, wie in anderen Proteinen üblich, einen (de-)protonierbaren Rest in räumlicher Nähe zu den Konstriktionen im Protein geben muss, der das Proton auf das Substrat überträgt.

Einleitung

Formiat-Nitrit-Transporter leiten schwache Säuren über biologische Membranen

Substrat-Passage durch FNTs nach dem *proton relay* im Neutralen

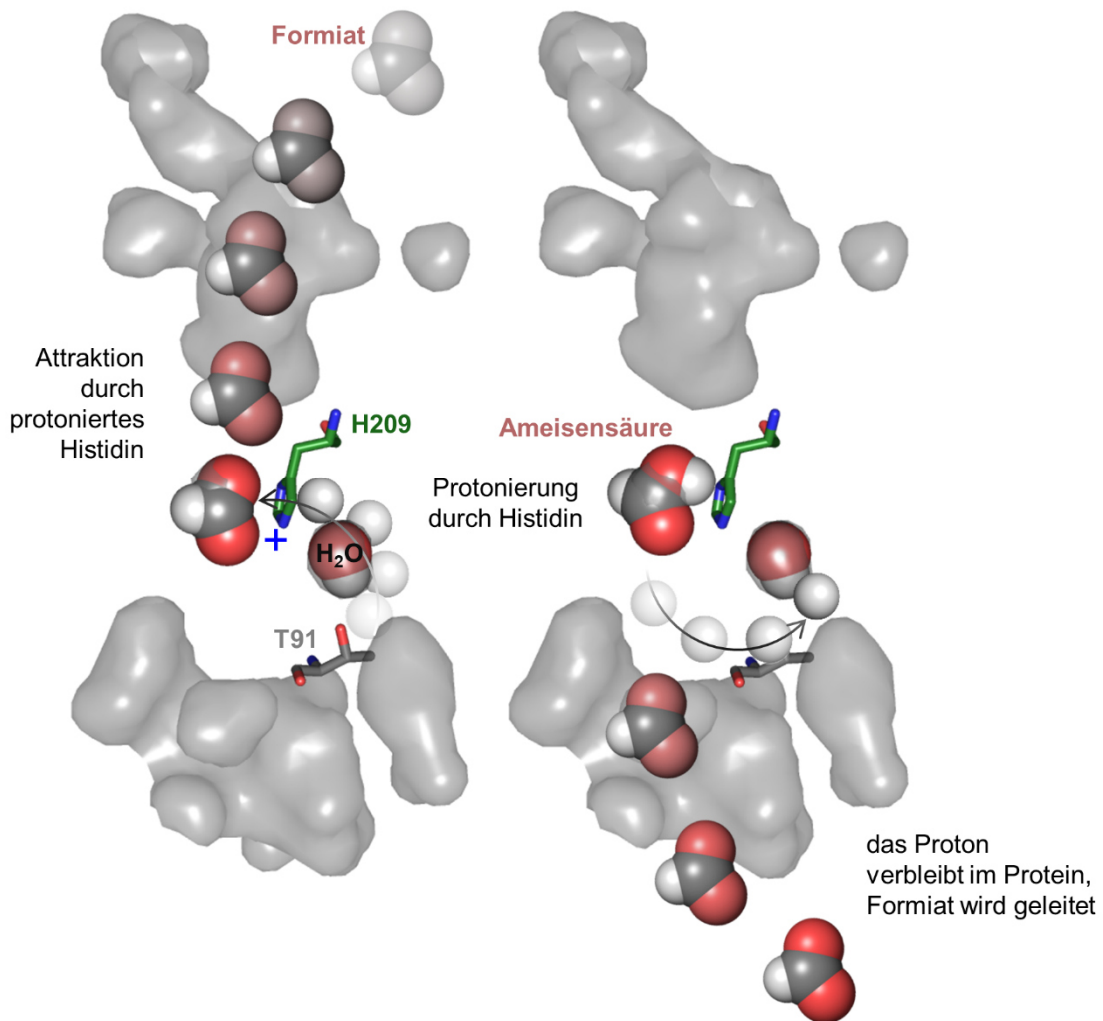


Abbildung 1-11: Die Passage von anionischen Substraten durch FNT nach dem *proton-relay*-Mechanismus im Neutralen: Formiat dringt in die Pore (grau: wasserzugänglicher Raum) und passiert die erste Konstriktion. Über das protonierte zentrale Histidin wird ein Proton auf das Anion übertragen und zur neutralen Ameisensäure. So kann die zweite Konstriktion passiert werden. Das aufgenommene Proton wird über das konservierte Threonin wieder von der Säure abgestreift und nur das Anion aus der Pore entlassen. In entgegengesetzte Richtung verläuft der Mechanismus gleich (Bild von rechts nach links betrachten). Formiat, Ameisensäure, das Proton und Wasser wurden manuell eingefügt.

Für den Import diene hierzu das konservierte Histidin, für den Export das über das konservierte Threonin koordinierte Wassermolekül. Das zentrale Histidin weist durch die hydrophobe Umgebung auch einen niedrigeren pK_s -Wert als im wässrigen Milieu auf und besitzt so die Säurestärke um ein Substrat wie Nitrit zu protonieren. Unter neutralen pH-Bedingungen streift das Substrat dieses Proton nach Passage der zweiten Konstriktion wieder ab und gibt es zurück in die His- H_2O -Thr-Kette. So wird netto nur ein anionisches Molekül geleitet, dies aber trotzdem im neutralen, protonierten Zustand, um die Hydrophobizität der Pore zu überwinden (Abbildung 1-11). Aufgrund des *internal proton cycling* wurde dieser

Einleitung

Mechanismus auch der *proton relay* (zu Deutsch: Protonen-Staffellauf) genannt. Im Sauren läuft der Mechanismus bis zur Passage der zweiten Konstriktion gleich ab, jedoch verbleibt dann das Proton nicht im FNT, sondern wird mit auf die andere Seite der Membran geleitet. Dies erklärt auch, warum elektrophysiologische Messungen im Sauren kein Signal mehr messen, da dann ein Kation und ein Anion gemeinsam die Membran passieren und netto keine Ladung über die Membran befördert wird. So gibt es nicht direkt ein H⁺-gekoppeltes *gating*, jedoch trotzdem einen Unterschied zwischen dem Mechanismus im sauren und neutralen Milieu: Im Neutralen verläuft die Passage des Anions passiv, kanalartig; im Sauren passiert ein Wechsel zu einem sekundär aktiven Transporter, getrieben vom Protonengradienten.

Erste *molecular-dynamics*-(MD)-Studien berechneten jedoch, dass das spontane Übertragen von Proton auf Formiat zu viel Energie benötigt, um spontan abzulaufen (Lv *et al.*, 2013). Eine spätere *in-silico* Studie zeigte, dass das zentrale Histidin im protonierten Zustand eine sehr hohe freie Enthalpie, ΔG_{Prot} , aufweist und somit eine Protonierung sehr unwahrscheinlich ist. Lediglich der gekoppelte Prozess von Eindringen des Anions und Protonierung des zentralen Histidins sei thermodynamisch möglich. Es sei also mehr ein simultaner Prozess von Eindringen des Anions und des Protons während der Substratpassage, ein konstant protoniertes Histidin sei an dem postulierten *proton-relay*-Mechanismus nicht beteiligt. Je nachdem, von welcher Seite der Membran das Proton die Pore erreicht und verlässt, findet dann ein elektroneutraler Symport oder eine elektrogene Passage des anionischen Substrates statt (Atkovska und Hub, 2017).

1.2.2.2 Der *dielectric-slide*-Mechanismus mit konstant neutralem Histidin

Sechs Jahre nach der Veröffentlichung des *proton-relay*-Mechanismus wurde diesem ein anderer gegenübergestellt (Wiechert und Beitz, 2017a, Wiechert und Beitz, 2017b). Durch hetero- und homologe Expression in *Saccharomyces cerevisiae* und in *E. coli* von eukaryotischem PfFNT und prokaryotischem EcFocA wurden experimentelle Daten mit einem direkten Aufnahme-Assay erhoben. Diese Experimente zeigten die Substratattraktion durch hoch-konservierte Lysine in das Porenvestibül (siehe Abbildung 1-9) und über die positive Oberflächenladung an, und nicht über ein positiv geladenes, protoniertes Histidin.

Einleitung

Formiat-Nitrit-Transporter leiten schwache Säuren über biologische Membranen

Substrat-Passage durch FNTs nach dem *dielectirc slide*

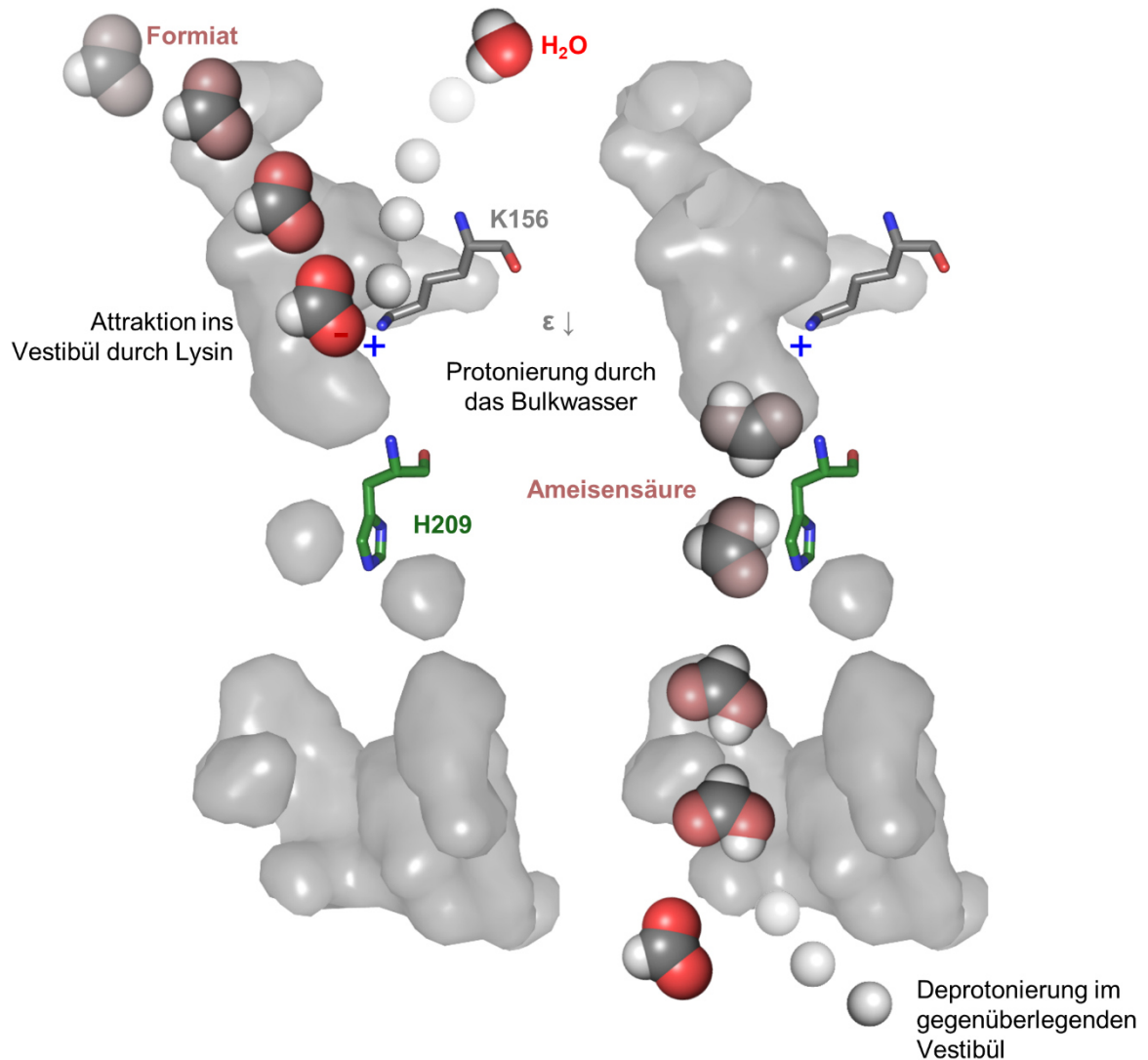


Abbildung 1-12: Die Passage von anionischen Substraten durch FNT nach dem *dielectirc slide*-Mechanismus: Formiat wird durch ein positiv geladenes Lysin in das Vestibül der Pore gezogen. Durch die hydrophobe Umgebung sinkt die Dielektrizitätskonstante ϵ . Dadurch verschiebt sich die Säurestärke so, dass eine Protonierung durch das Bulkwasser möglich wird. Als neutrale Ameisensäure kann das Substrat beide Konstriktionen passieren und erst auf der gegenüberliegenden Seite im Vestibül wieder deprotonieren. In entgegengesetzte Richtung verläuft der Mechanismus gleich (Bild von rechts nach links betrachten).

Dies wurde durch *in-vitro* Mutagenese, welche die positive Ladung entfernte oder verstärkte und die initialen Transportraten damit verlangsamten oder beschleunigten, untermauert. Demnach verschiebt sich durch die hydrophobe Umgebung des Vestibüls die Säurestärke des Substrates (Vergleich Abbildung 1-1, die Kurve wird nach rechts verschoben), da die Dielektrizitätskonstante sinkt. Dadurch wird die Protonierung des Substrates erleichtert. So ergab sich auch der Name des so postulierten *dielectirc slide*-Mechanismus. Messungen mit deuteriertem Wasser (schweres Wasser, D₂O) zeigten zudem, dass nur ein

Einleitung

Protonierungsschritt am Transportmechanismus beteiligt ist. So wurde gefolgert, dass das Proton direkt auf das Substrat übertragen wird, aber nicht in mehreren Schritten über eine Wasserstoffbrückenkette. Die Protonierung erfolgt diesem Mechanismus nach durch das Bulkwasser. Neutralisiert passiert das Substrat dann beide hydrophoben Konstriktionen und das zentrale, stets neutrale Histidin (Abbildung 1-12). Das Messen des pH-Wertes des Mediums während der Substrataufnahme und eine Zugabe von Protonophoren zeigte zudem die Protonen-Abhängigkeit des Transportes. Es wurde außerdem, widersprüchlich zu den elektrophysiologischen Messungen, beobachtet, dass bei Absinken des Medium-pHs die initiale Transportrate nicht versagt, sondern exponentiell ansteigt. Dies zeigte, dass das neutralisierte Substrat oder ein Anion zusammen mit einem Proton zusammen geleitet wird und die protonenmotorische Kraft (PMF) die Passage treibt.

1.2.2.3 Die Direktionalität der Substratpassage durch FNT

Aktuelle Studien mit einem homologen Reportergergen-*E. coli*-System und Messung der externen Wasserstoff- und Formiat-Konzentration von fermentierenden *E. coli* sprechen sich für einen dritten Transportmechanismus, abweichend vom *proton relay* und *dielectric slide* aus. Es wurde beobachtet, dass bei Mutation des zentralen Histidins zu Asparagin, Glutamin, Isoleucin und Threonin ein Export von Formiat noch immer möglich ist, der Import hingegen nicht (Kammel *et al.*, 2022a; Kammel *et al.*, 2022b). Eine Schlüsselfrage war hierbei stets, wie das EcFocA die Richtung der Passage des Substrates unterscheiden kann. Es wurde gefolgert, dass der Protonierungszustand des zentralen Histidins die Richtung vorgibt und neutral den Export erlaubt, protoniert den Import (Kammel *et al.*, 2022a; Kammel *et al.*, 2022b). So soll *in-vivo* die Formiat Homöostase kontrolliert sein (Kammel und Sawers, 2022). Nur in Importrichtung könne der *proton-relay*-Mechanismus greifen. Frühere Ergebnisse aus diesem Messsystem sagten dem L79, dem F202 und dem E28 bereits die Regulation des Exportes sowie dem T91, dem H209 und dem N213 die des Importes zu (Hunger *et al.*, 2014). So wurde gefolgert, dass die porenbegrenzenden Aminosäuren die Richtung des Transportes vorgeben. Diese Quellen sind die einzigen, die das zentrale Histidin nicht als essenziell für ein funktionsfähiges FNT einstufen. Es wird damit postuliert, dass FNT für Im- und Export zwei unterschiedliche

Transportmechanismen aufweisen, die sowohl von *proton relay* als auch *dielectric slide* abweichen. Sie wurden jedoch bisher nicht ausformuliert.

1.2.2.4 Der Disput um das zentrale Histidin zwischen den hydrophoben

Konstriktionen

Die postulierten Mechanismen unterscheiden sich maßgeblich in der Rolle, die dem zentralen Histidin zukommt. Zur Diskussion um den Protonierungszustand des zentralen Histidins werden immer wieder die wenigen FNT angebracht, die kein zentrales Histidin aufweisen. Es gibt in der FNT-Datenbank dbFNT (Mukherjee *et al.*, 2017; abgerufen 2017 von Prof. Dr. E. Beitz) insgesamt 28 FNT ohne zentrales Histidin, die an dieser Stelle ein Asparagin, Glutamin oder Prolin aufweisen. Sie decken damit einen Anteil von 1,2 % aller FNT der Datenbank ab. Die meisten dieser FNT mit moduliertem zentralem Histidin weisen sonst kaum Mutationen in den konservierten Bereichen auf. Lediglich drei weisen ein Asparagin anstelle eines konstriktionsbildenden Phenylalanins und ein Glycin an der Position des konstriktionsbildenden Alanins auf.

Studien an zwei dieser FNT ohne zentralem Histidin, dem *Entamoeba histolytica* FNT (EhFNT) und *Bacillus thuringiensis* FdhC (BtFdhC), zeigten einen pH-gekoppelten Transport über eine Spanne von pH 4,8 bis 7,8. Dies unterstrich damit den *dielectric-slide*-Mechanismus mit neutralem Histidin, da kein protonierbarer Rest in der Pore dieser FNT zu finden ist, aber eine ungehinderte pH-gekoppelte Substratpassage (in Import-Richtung) gegeben war (Helmstetter *et al.*, 2019).

Mutationen am zentralen Histidin des EcFocA zeigten den Wandel zu einem Uniporter (Kammel *et al.*, 2022a, 1.2.2.3). Dem gegenüber stehen alle sonstigen in der Literatur beschriebenen Experimenten, in denen die Position des zentralen Histidins mutiert wurde (zum Asparagin, Glutamin, Phenylalanin oder Alanin) bei denen die Funktion in jedem Falle vollständig versagte (Lü *et al.*, 2012b; Wiechert und Beitz, 2017b; Helmstetter *et al.*, 2019; Lyu *et al.*, 2021). So lässt sich ableiten, dass das Histidin tatsächlich essenziell ist, aber die Aussage über den Protonierungszustand ist widersprüchlich.

Alle drei postulierten Mechanismen beschränken sich auf die Erklärung, wie ein anionisches Substrat vom FNT angezogen, neutralisiert und geleitet wird. Wie andere Solute oder Wasser vom Transport ausgeschlossen werden, erklärt keiner

der Mechanismen, und die spezifische Anionenselektivität ist nur indirekt aus den postulierten Mechanismen abzuleiten.

1.2.2.5 Die unbekannte Rolle der hydrophoben Konstriktionen innerhalb der FNT

Das zentrale Histidin innerhalb der Pore sitzt im FNT zwischen den hydrophoben Konstriktionen (Abbildung 1-6). Diese sind, ebenso wie das Histidin, hoch konserviert (Abbildung 1-9). Nur wenige Vertreter der NirC- und HSC Subtypen weisen überhaupt Änderungen hier auf (Mukherjee *et al.*, 2017). Trotz des hohen Konservierungsgrades werden sie aber von keinem der beschriebenen Mechanismen einbezogen. Ihre Hydrophobizität spielt zwar im *dielectric-slide*-Mechanismus eine Rolle, wurde jedoch nicht näher untersucht; die Enge der Pore wird zudem nicht mit einbezogen. Gleiches gilt für den *proton-relay*-Mechanismus, der lediglich das Histidin und das Threonin berücksichtigt.

Erste Experimente zu den Konstriktionen in Proteoliposomen mit moduliertem EcFocA zeigten, dass eine erhöhte Aufnahmekapazität nach Mutation der konstriktionsbildenden Aminosäuren zum Alanin erreicht wird und postulierten so eine ratenbestimmende Funktion (Wang *et al.*, 2009). Da die AQP-Konstriktionen sich in Ladung und Durchmesser von den FNT unterscheiden, wurden keine Funktionen für die FNT-Konstriktionen aus der strukturellen Ähnlichkeit abgeleitet (1.2.1.1). Es wurde lediglich überlegt, ob die Konstriktionen eine *gating*-Funktion analog einem hydrophoben Methionin im AQP0 übernehmen können (Gonen *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009).

Bevor der *proton-relay*-Mechanismus beschrieben wurde, konnten in den Konstriktionen valin- und isoleucinsubstituierte Varianten des CdHSC der Röntgenkristallographie zugänglich gemacht werden (Czyzewski und Wang, 2012). Sie zeigten, wie zu erwarten, einen dadurch vergrößerten Porendurchmesser (Abbildung 1-13). Außerdem konnte ein anionisches Substrat in der Struktur mit aufgelöst werden. Experimente mit diesen Varianten in Proteoliposomen bestätigten die erhöhten Aufnahmekapazitäten. Es wurde postuliert, dass nach Erweiterung einer Pore Wassermoleküle bis zum zentralen Histidin vordringen könnten (Czyzewski und Wang, 2012).

Einleitung

Formiat-Nitrit-Transporter leiten schwache Säuren über biologische Membranen

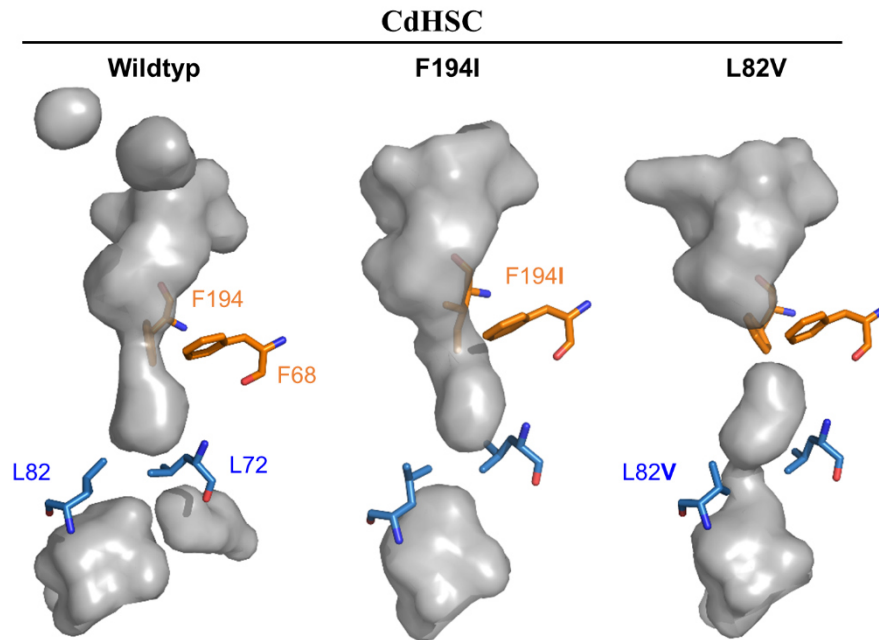


Abbildung 1-13: Modulationen der Konstriktionen (exoplasmatisch: orange, zytoplasmatisch: blau) des CdHSC lieferten Kristallstrukturen mit erweiterten Konstriktionen. Der Wildtyp (links) zeigt zwei Verjüngungen im Transportpfad (grau: lösungsmittelzugänglicher Raum), nach F194I-Substitution erweitert sich die exoplasmatische Konstriktion (Mitte) nach L82V-Mutation die zytoplasmatische (rechts). Abbildung erstellt anhand PDB #3TDR, #3TDS, #3TDX.

Experimente am PfFNT hingegen zeigten bei Substitution eines konstriktionsbildenden Phenylalanins zum Alanin eine deutliche Verringerung der Aufnahmeraten und widersprachen so der Hypothese, dass die Konstriktionen die passierende Substratmenge diskriminieren (Lyu *et al.*, 2021). Ergebnisse des indirekten Reporterassays *in-vivo* in *E. coli* (1.2.2.3) postulierten, dass jede Konstriktion auf nur eine Richtung der Substratpassage Einfluss hat (Hunger *et al.* 2014, 1.2.2.3). Eine Hypothese, dass die periplasmatische Konstriktion als Wasserbarriere dienen könne, um das Substrat von der Substrathülle zu befreien, steht ebenfalls zur Debatte, wurde jedoch nicht experimentell geprüft (Waight *et al.*, 2013).

Eine ehemals postulierte größendiskriminierende Filterfunktion (Waight *et al.*, 2013) konnte durch die Charakterisierung des porenvorgelagerten Größenausschlussfilters (sogenannte Φ/K -Region) ausgeschlossen werden (Wiechert *et al.*, 2017). Mit dieser Verjüngung im Vestibül vor der periplasmatischen Konstriktion wird in einem FNT das anionische Substrat nach der Größe selektiert. Die Querschnittsfläche die sich hier ergibt muss groß genug für alle zugänglichen Substrate sein. So schließt beispielsweise das EcFocA Milchsäure aus, die das eukaryotische PfFNT leitet.

Jedoch wurde den Konstriktionen bei Entdeckung dieses Größenselektivitätsfilters keine neue Rolle zugeschrieben und so blieb sie seit jeher unbekannt.

1.3 Zielsetzung

Die Datenlage in der Literatur zum FNT-Transportmechanismus ist widersprüchlich, wobei die Rolle des zentralen Histidins hier die größte Divergenz zu einem früher postulierten *proton-relay*-Mechanismus (Lü *et al.*, 2013) und dem aktuelleren *dielectric-slide*-Mechanismus (Wiechert und Beitz, 2017a) darstellt. Neue *in-vivo*-Studien (Kammel *et al.*, 2022a; Kammel *et al.*, 2022b) widersprechen beiden Mechanismen in Teilen. Zudem ist nicht bekannt, wie die Konstriktionen, die dieses Histidin umrahmen, ins Bild des jeweilig postulierten Mechanismus passen, denn sie beziehen diese hoch konservierten Regionen nicht oder nur für eine Richtung der Substratpassage mit ein. Die Hypothesen über ihre Funktion reichen weit von *gating* über ratendiskriminierend bis hin zur Richtungsweisung und Selektivitätsfilter-Eigenschaften.

Deshalb sollten die FNT-Konstriktionen durch zielgerichtete *in-vitro* Mutagenese in zwei verschiedenen FNT moduliert und ihre Funktion für die erfolgreiche Monocarboxylatpassage durch FNT mittels heterologer Expression in *S. cerevisiae* untersucht werden. Damit sollten auch Fragen zur Regulation der Transportrichtung, zur Substratselektivität und zur Substratneutralisierung während der Passage beantwortet und der Protonierungszustand des von den Konstriktionen umrahmten Histidins untersucht werden.

2 | Material und Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden Substanzen in doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) gelöst.

2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
96-well-plate Counter MicroBeta Trilux	Perkin Elemer, Langenfeld
Bio Photometer	Eppendorf AG, Hamburg
Biometra TRIO - Triple Powered PCR thermal cycler	Analytik Jena, Jena
Brutschrank Kelvitron® T	Heraeus, Hanau
Brutschrank Minitron	Infors HAT, Bottmingen, Schweiz
ChemoStar Touch ECL und Fluorescence Imager	Intas Science Imaging, Göttingen
Digitaler Blockheizer HX-2	PeqLab, Erlangen
Digitales pH-Meter, Lab 850	Schott Instruments, Mainz
Dispensette® BRAND® S Organic, Analog-adjustable bottle-top dispenser	Merck, Darmstadt
Heizblock Techne Dri-block heater DB-2D	Thermo Fisher, Scientific, Schwerte
Kolben-Orbitalschüttler Certomat ® MO II	Sartorius, Göttingen
Kühlschrank zur Hefetemperierung, MF-6W	Waeco, Emsdetten
Kühlzentrifuge, Perfect Spin 24 R refrigerated	PeqLab, Erlangen
Mikroskop Olympus IX 50 inverted Fluorescence Phasecontrast Microscope	Olympus, Hamburg
MultiScreenHTS Vacuum Manifold	Merck, Darmstadt
Optima™ XL-80K Ultrazentrifuge, Rotor 50,2 Ti	Beckman Coulter, Krefeld
PCR-Thermocycler, Dualblock Primus advanced HT2X	Clemens, Waldbüttelbrunn
pH Elektrode, Blue Line 12pH	SI-Analytics, Weilheim
Pipetten	Gilson, Middleton, USA; Eppendorf AG, Hamburg
Power Pac 200 mit Trans Blot Semi-Dry Transfer Cell	Bio Rad, München
Quarzküvette	Helma, Jena
Rotationsmischer für Reagenzgläser TC-7	New Brunswick Scientific, Edison, USA
SDS-Gelgießkammer und -Laufkammer	PeqLab, Erlangen
Sterilwerkbank Heraguard	Heraeus, Hanau
Stopped-Flow-Apparatur:	Jasco, Gross-Umstadt

Material und Methoden

Chemikalien und Kits

Zubehör: Spannungsquelle ALX 250, Verstärker PMS 250, Mikroprozessor Einheit MPS 70/2, Fluoreszenzküvette FC-15/7,5, Mischeinheit SFM 2000, UV/-Vis- und Fluoreszenzphotometer MOS-200, Monochromator BH-10-61 UV, BioKine Software Version 32 V4.74.2	
ThermoCompact <i>digital microplate shaker</i>	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Tischzentrifuge Isotopenlabor <i>wise spin</i> CF-10	Wisd, PMI Laboretchnik, Wettingen
TRI-CARB 2000TR <i>Liquid Szintillation Analyzer</i>	Perkin-Elmer, Langenfeld
Vortex® Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wippschüttler WS 10	Edmund Bühler, Hechingen
Zählkammer Fuchs Rosenthal, 0,2 mm Tiefe, 0,0625 mm ²	Assistent, Sondheim an der Röhn
Zentrifuge, <i>Perfect Spin</i> 24 Plus	PeqLab Erlangen

2.2 Chemikalien und Kits

Substanz	Anbieter
Acrylamid, Rotiphorese® Gel 40	Carl Roth, Karlsruhe
Adenin	Sigma Aldrich, München
Agar <i>bacteriological</i>	New England BioLabs GmbH, Frankfurt
Agarose, LE	Genaxxon BioScience, Ulm
Ammoniumpersulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Genaxxon BioScience, Ulm
Anti-Hämagglutinin-Antikörper, Maus, monoklonal	Roche, Mannheim
Anti-Penta-His-Antikörper, Maus, monoklonal	Qiagen, Hilden
Anti-Maus-Antikörper, <i>Peroxidase AffiniPure IgG</i> , Ziege an	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Bradfordreagens, <i>Quick Start™ Bradford Protein Assay</i>	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe
BSA, Rinderserumalbumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Carboxyfluorescein Diacetate N-Succinimidylester	Sigma Aldrich, München
<i>Clarity™ Western ECL Substrate Kit</i>	Bio-Rad, München
D-(+)-Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
D-Biotin	Carl Roth, Karlsruhe

Material und Methoden

Chemikalien und Kits

Deuteriumoxid (schweres Wasser)	Sigma Aldrich, München und Eurisotop, Saarbrücken
Difco™ <i>Yeast Nitrogen Base</i> (YNB), ohne Aminosäuren	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg
Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich, München
Dithiothreitol	Carl Roth, Karlsruhe
DNA-Natriumsalz Typ III von Lachssperma	Sigma Aldrich, München
Eisen(III)chlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure	J. T. Baker, München
Ethanol	J. T. Baker, München
Formiat, Natriumsalz	Merck, Darmstadt
Formiat, Natriumsalz, C-14-markiert	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig
Glucose	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerol, C-14-markiert	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig
HCl	Carl Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt, <i>Bacto™ Yeast Extract</i>	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	J. T. Baker, München
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Kupfer(II)sulfat	Merck, Darmstadt
LB-Agar, <i>lennox</i>	Carl Roth, Karlsruhe
LB-Medium-Pulver, <i>lennox</i>	Carl Roth, Karlsruhe
L-Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
L-Histidin	Carl Roth, Karlsruhe
L-Histidin	Sigma Aldrich, München
Lithiumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
L-Laktat, Natriumsalz	AppliChem, Darmstadt
L-Laktat, Natriumsalz, C-14-markiert	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig
L-Leucin	Carl Roth, Karlsruhe
L-Prolin	Carl Roth, Karlsruhe
L-Tryptophan	Sigma Aldrich, München
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
MES	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	J. T. Baker, München
Methionin	Sigma Aldrich, München
Methylamin 40 %	Sigma Aldrich, München
MicroScint-20	Perkin Elmer, Rodgau
MOPS	Carl Roth, Karlsruhe
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumiodid	Sigma Aldrich, München
Natriummolybdat	Carl Roth, Karlsruhe

Material und Methoden

Chemikalien und Kits

Nucleotide (dNTPs)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Oxoid Agar	Oxoid, Basingstoke USA
Pepton, <i>Bacto™ Pepto</i>	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg
PeqGOLD Prestained Protein Marker III	Peqlab, Erlangen
PfuTurbo DNA Polymerase AD und 10xPuffer	Aglient, Santa Clara USA
Polyethylenglycol 3500	Sigma Aldrich, München
Propionat, Natriumsalz	Sigma Aldrich, München
Quicksafe A, flüssiger Scintillationscocktail	Zinsser Analytic, Eschborn
Restriktionsendonucleasen	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Rotiszint®, flüssiger Scintillationscocktail	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure	J. T. Baker, München
Schwefelsäure	J. T. Baker, München
SDS	Appllichem, Darmstadt
TEMED	Genaxxon bioscience, Ulm
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
TWEEN20®	AppliChem, Darmstadt
Vitamin B1	Carl Roth, Karlsruhe
Vitamin B5	Carl Roth, Karlsruhe
Vitamin B6	Carl Roth, Karlsruhe
Whatman® Chromatographie Filterpapier	GE Healthcare, Freiburg
<i>Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System</i>	Promega, Mannheim
Zinksulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Zitronensäure	Carl Roth, Karlsruhe
Zymolyase, <i>yeast lytic enzyme 20-T</i>	Carl Roth, Karlsruhe

2.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Anbieter
0,2-mL-Reaktionsgefäße und 8-er-Streifen	Sarstedt, Nümbrecht
1,5-mL-Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
96-well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht
Amersham™ Hybond® 0.45 PVDF-Membranen	GE Healthcare, Freiburg
Deckgläser 30 mm Durchmesser	Assistent, Sondheim an der Röhn
Diverse Glasgeräte	Schott Instruments, Mainz
Einmalspritzen NORM-JECT®	Eydam, Kiel
Glasskugeln, säuregewaschen (Ø 425-600 µm)	Sigma Aldrich, München
Borosilicatifilter, <i>Glassmicrofibre filters</i> Whatman™ Cytiva	VWR, Hannover
Multiscreen HTS 96 HV <i>Filter Plate</i> , Opaque	Merck, Darmstadt
Parafilm® M	Bemis, Neenah, USA
Partikelfilter Filtropur S (Ø 0,45 µm)	Sarstedt, Nümbrecht
Pasteurpipetten	Eydam, Kiel
Petrischalen eckig, 120 x 120 x 17 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen rund	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Szintillationsgefäße, Snaptwist <i>Scintillation vials</i> 6,5 mL	VWR, Hannover
Sterilfilter Filtropur S (Ø 0,2 µm)	Sarstedt, Nümbrecht
Ultrazentrifugengefäß (1,5 ml, PP)	Beckmann Coulter, Krefeld

2.4 Kodierende DNA, Vektoren und Oligonukleotide

Genprodukt	Gen-ID NCBI	Vektor	Bereitgestellt durch
EcFocA	945513	pDRTXa	Wiechert und Beitz, 2017b
Fps1	850683	pHARS416	Krenc <i>et al.</i> , 2013
PfFNT	814480	pDRTXa	Wu <i>et al.</i> , 2015
rAQP1	25240	pHARS426	Beitz <i>et al.</i> , 2006
hAQP9	366	pDRTXa	Rothert <i>et al.</i> , 2017
LeAMT1;1	101265282	pDR196	Krenc, 2012
hMCT1	NM_001166496.1	pDRTXa	Köpnick <i>et al.</i> , 2020
TbAQP2	AJ697890.1	pHARS426	Uzcategui <i>et al.</i> , 2004

Kodierende DNA für das jeweilige Wildtyp-Protein stand in einen Vektor ligiert (pHARS426: Mumberg *et al.*, 1994; pDR196: Wipf *et al.*, 2003; pDRTXa Wu *et al.*, 2015) zur Verfügung und war durch den Promotor und die Resistenzgene an die Expression in der Hefe und Vervielfältigung in *E. coli* (2.7) angepasst. Die

Material und Methoden

Kodierende DNA, Vektoren und Oligonukleotide

verwendeten Vektoren trugen alle ein Ampicillin-(Amp)-Resistenzgen und eine dem Insert vorgelagerte Sequenz für einen Hämagglutinin-Anhang (HA-*tag*), der so N-Terminal mit exprimiert wurde. Zudem lag im pDRTXa-Vektor nach dem *Insert* die Sequenz kodierend für einen 10x-Histidin-Anhang (His-*tag*), wodurch im exprimierten Protein C-terminal zehn Histidine angehängt wurden. Leerplasmide beschreiben die jeweiligen Plasmide in die kein Gen ligiert wurde.

Oligonukleotide zur zielgerichteten Mutation der verwendeten Gene wurden sowohl von Thermo Fischer, Schwerte, als auch von Eurofins, Ebersberg, als Lyophilisat bezogen, zu 100 μ M gelöst und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Tabelle 2: Sequenzen der für die *in-vitro*-Mutagenese und Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide in 5'→3'-Richtung, *forward* (fw) oder *reverse* (rv). Die für Mutationen kodierenden Abschnitte sind jeweils fett markiert. Oligonukleotide, die bereits in der Masterarbeit verwendet und entworfen wurden, sind mit einem (*) markiert (Schmidt, 2018).

Oligonukleotid	Sequenz, 5'→3', Mutationen jeweils fett
EcFocA F75A fw (*)	GTTGGCGGCATTTGC GCAT CTCTGGGG
EcFocA F75V fw	GGCGGCATTTGC GTCT CTCTGGGGCTGATT
EcFocA F75L fw	GGCGGCATTTGC CTCT CTCTGGGGCTGATT
EcFocA F75N fw	GGCGGCATTTGC AACT CTCTGGGGCTGATT
EcFocA F75R fw	GGCGGCATTTGC CGCT CTCTGGGGCTGATT
EcFocA F75X rv (*)	GCAAATGCCGCCAACCAGTTTTGCCATGCC
EcFocA F75A/L79A fw (*)	GTTGGCGGCATTTGC GCAT CTCTGGGG GCG- ATTCTTTGTGTTGTC
EcFocA F75A/L79A rv	GCAAATGCCGCCAACCAGTTTTGCCATGC
EcFocA L79A fw	TCTCTGGGG GCG ATTCTTTGTGTTGTCT
EcFocA L79A fw opt.	CTCTGGGG GCG ATTCTTTGTGTTGTCT
EcFocA L79A rv	AGAGAGAAGCAAATGCCGCCAAC
EcFocA L89A fw (*)	TGCGGAGCCGATGCATTTACTTCCACCGTG
EcFocA L89A rv (*)	ATCGGCTCCGCAGACAACACAAAGAAT
EcFocA F202A fw (*)	CCGGTCGCGATG GCT GTTGCCAGCGGTTTT
EcFocA F202L fw	CCGGTCGCGATG TTAG TGTTGCCAGCGGTTTT
EcFocA F202V fw	CCGGTCGCGATG GTT GTTGCCAGCGGTTTT
EcFocA F202X rv (*)	CATCGCGACCGGCAGCACCATAATGAACGC
EcFocA A212G fw	GAGCACAGTATC GGA AACATGTTTATGATC
EcFocA A212G rv	GATACTGTGCTCAAACCGCTGGCAACAAA
EcFocA H209P fw	AGCGGTTTTGAG CC AGTATCGCAAACATG
EcFocA H209Y fw	AGCGGTTTTGAG TAC AGTATCGCAAACATG
EcFocA H209X rv	CTCAAACCGCTGGCAACAAACATCGCG

Material und Methoden

Zelllinien

PfFNT F90A fw	TTTGTGTACGGCGCTACATTTCCGATAGCA
PfFNT F90A rv	TGTAAGCCGTACACAAAGACACTCATAGA
PfFNTF94A/L104A fw	CCGATAGCAGCCATGTGCATCATCTGTACCG-GTTCCGGATGCGTTTACCGGTAATA
PfFNT L104A fw	ACCGGTTCCGGATGCTTTTACCGGTAATACA
PfFNT L104A rv	ATGTGCATCATCTGTACCGGTTCCGGAT
PfFNT F223A fw	GCAGTTTATGCCGCTGCGATTGCCGGCTAT
PfFNT F223A rv	GTATTTTCTGTGTTCTTTGCAGTTTATGCC
PfFNT V196L fw	GGGTTGTAACATATTTCTATGCTTGGCGGT
PfFNT V196 rv	AAATATGTTACAACCCACGGCTAAGCTAAC
PfFNT G21E fw	AAAAGCGTGTGCGGAGAGGAAGAAAGCTA
PfFNT G21E rv	TCCGCACACGCTTTTGATAGAAACAGGGTC
PMA 5 seq fw	CTCTCTTTTATACACACATTC
ADH 3 seq rv	CATAAATCATAAGAAATTTCGC
MET seq fw	AGTAAAGCGTCTGTTAGAAAGG
CYC seq rv	ATAGGGACCTAGACTTCAG

2.5 Zelllinien

Zelllinie	Genotyp, knock-outs fett	Quelle	Zusätze zum Nährmedium
DH5 α , <i>E. coli</i>	F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96relA1 λ -	Hanahan, 1983	Ampicillin
W3031A Δ jen1 Δ ady2, <i>S. cerevisiae</i>	MATa; leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11-15 jen1::kanMX4 ady2::hphMX4	M. Casal, Braga, Portugal; Casal <i>et al.</i> , 1999	AHLW
BY4742 Δ fps1, <i>S. cerevisiae</i>	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 fps1::KanMX4	Euroscarf, Frankfurt	KHL
BY4741 Δ fps1 Δ stl1, <i>S. cerevisiae</i>	MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 stl1Δ::loxP fps1Δ::loxP	H. Sychrova, Prag, Tschechien	MHL
CY162, <i>S. cerevisiae</i>	MAT α ura3-52 trk1Δ his3Δ200 his4-15trk2Δ1::pCK64	Anderson <i>et al.</i> , 1992	2xK, 2xH, L, 2 mM KCl
31019b, <i>S. cerevisiae</i>	MATa ura3 mep1Δmep2Δ::LEU mep3Δ::KanMX2	Marini <i>et al.</i> , 1997	KHL
31019b Δ fps1, <i>S. cerevisiae</i>	MATa ura3 mep1Δmep2Δ::LEU mep3Δ::KanMX2 fps1Δ0	E. Beitz, Kiel	KHL

2.6 Transformation und Lagerung von *E. coli*

LB-Medien							
flüssig		flüssig +Amp		fest		fest +Amp	
20 g	LB-Medium-Pulver	1 mL	1 g/10 mL Ampicillin	35 g	LB-Agar	35 g	LB-Agar
ad 1 L	ddH ₂ O	ad 1 L	autoklaviertes LB-Medium	ad 1 L	ddH ₂ O	ad 1 L	ddH ₂ O
autoklavieren				autoklavieren		autoklavieren	
						1 mL	1 g/10mL Ampicillin

Zur Transformation von *E. coli* mit den gewünschten Plasmiden wurde 0,5 µL reine Plasmidlösung (200-600 µg/µL) zu 100 µL kompetenter *E. coli*-Kultur, zur Verfügung gestellt von Anna Fuchs, auf Eis gegeben. Nach Inkubation für 30 min wurde der Ansatz auf festem LB-Amp verteilt.

Zur Transformation mit PCR-Produkten (2.8) wurden hiervon 10 µL zu 100 µL kompetenter *E. coli*-Kultur auf Eis gegeben. Nach Inkubation für 30 min erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45-60 s und Kühlen für 10 min auf Eis. Der Ansatz wurde mit 900 µL LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Die Zellen wurde gesammelt (10.000 g, 30 s), in 100 µL Überstandslösung resuspendiert und auf festem LB-Amp ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C konnten so mit der entsprechenden DNA transformierte *E. coli*-Kolonien angezogen werden.

2.7 Isolation und Sequenzierung von Plasmid-DNA

Von den angewachsenen *E. coli*-Kolonien wurden eine (Plasmidamplifikation) bzw. vier (PCR-Produkte) je Transformations-Ansatz isoliert, in je 5 mL flüssiges LB-Amp-Medium überführt und über Nacht unter konstantem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Die Plasmidisolation wurde aus 4 mL dieser Kulturen mittels *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* durchgeführt. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde ohne alkalische Proteaselösung gearbeitet und mit 50 µL ddH₂O eluiert. Die Konzentration der so gereinigten Plasmidisolate wurde photometrisch bestimmt. Hierfür wurde die Absorption einer 1:25 verdünnten Probe bei 260 nm bestimmt. Zusätzlich wurde die Reinheit der Probe über die Absorption bei 280 nm im Verhältnis zur Absorption bei 260 nm geprüft. Zur Kontrolle der Sequenz des *Inserts* wurde dieses mit vor und nach dem *Insert* bindenden Oligonukleotiden (2.4) am Institut für klinische Molekularbiologie, IKMB,

Kiel, nach Sanger sequenziert. Hierfür wurden je 3 µL 100 mM Plasmid-Lösung und 1 µL 4,8 mM Oligonucleotid zusammengegeben.

2.8 Zielgerichtete *in-vitro* Mutagenese

dNTP-Mix

90 mM ATP

je 60 mM GTP, UTP und CTP

sterilfiltrieren

Zum gezielten Einbringen von Mutationen im untersuchten Gen, wurde das Protokoll *QuickChange®: Site-Directed Mutagenesis* von Stratagene verwendet. Abweichend trug lediglich ein Oligonukleotid die Information zum Basenaustausch. Das jeweils gegenläufige Oligonukleotid setzte direkt *upstream* der einzuführenden Mutation an und war durchgehend komplementär zum Ausgangsgen. Hierfür wurde das Ausgangsplasmid mit den spezifischen Mutagenese-Oligonukleotiden (2.4) mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die Zusammensetzung des PCR-Reaktionsgemisches erfolgte nach Tabelle 3, die Reaktion folgte den Bedingungen in Tabelle 4. Hierbei wurde die optimale Temperatur der verwendeten Oligonukleotide zum Anlagern dieser an den denaturierten DNA-Strang nach Formel (1) berechnet. Wenn sich diese berechneten optimalen Temperaturen bei den zusammen eingesetzten Oligonukleotiden unterschieden, wurde stets die niedrigere gewählt. Das PCR-Produkt wurde zur Vervielfältigung und Zyklisierung in *E. coli*-Zellen transformiert (2.6). Das Einbringen der entsprechenden Mutation wurde durch Sequenzierung des anschließend isolierten Plasmides überprüft (2.7).

$$T = 60 + (0,41 \text{ GC}) - \frac{600}{\text{bp}} \quad (1)$$

wobei:

T = optimale Temperatur für das Anlagern der Oligonukleotide in °C

GC = GC-Gehalt des Oligonukleotides in %

bp = Basenpaarlänge des Oligonukleotides

Material und Methoden

Transformation und Lagerung von *S. cerevisiae*

Tabelle 3: Reaktionsansatz für die *in-vitro* Mutagenese eines in einen Vektor ligierten Gens.

Volumen / μ L	Reagens
0,5	Ausgangsplasmid
1,5	Oligonukleotid fw, (25 μ M)
1,5	Oligonukleotid rv, (25 μ M)
4	NTP-Mix
5	10x <i>Pfu</i> -Puffer
0,8	<i>Pfu</i> Turbo DNA Polymerase (2,5 U μ L ⁻¹)
1,5	DMSO
35,2	ddH ₂ O

Tabelle 4: Reaktionsbedingungen für die *in-vitro* Mutagenese eines in einen Vektor ligierten Gens. Die Temperatur zum Anlagern der Oligonukleotide (*) wurde je nach Schmelztemperatur dieser angepasst (Formel (1)).

Temperatur / $^{\circ}$ C	Dauer /min	
95	5	
95	0,5	16 Zyklen
57-68*	1	
68	8	
68	20	
8	max. 18 h	

2.9 Transformation und Lagerung von *S. cerevisiae*

YPD-Medium	SD-Medien für Hefen	
20 g Pepton	flüssig	fest
10 g Hefeextrakt	1,7 g YNB	20 g Oxoid Agar
20 g Glucose	5 g (NH ₄) ₂ SO ₄	ad 1L SD-Medium, flüssig
ad 1L ddH ₂ O	20 g Glucose	
autoklavieren	pH 5,2, autoklavieren	
	Zusätze zugeben	

Zusätze zum SD-Medium /mL

-AHLW	-KHL	-MHL
5 0,5 % (m/V) Adenin	1 2 % (m/V) Lysin	5 2 % (m/V) Methionin
1 2 % (m/V) Histidin	5 2 % (m/V) Histidin	5 2 % (m/V) Histidin
5 2 % (m/V) Leucin	2 2 % (m/V) Leucin	2 2 % (m/V) Leucin
2 0,5 % (m/V) Tryptophan		

nach dem Autoklavieren, vor dem Aushärten zugeben.

S. cerevisiae-Zellen wurden mittels der Lithiumacetat-Methode nach Gietz transformiert (Gietz *et al.*, 1995). Hierfür wurde eine naive *S. cerevisiae*-Kolonie des gewünschten Stammes in 5 mL YPD-Medium überführt und über Nacht bei

Material und Methoden

Membranproteinisolation aus *S. cerevisiae*

konstantem Schütteln bei 30 °C inkubiert. Diese Kultur wurde in 40-50 mL YPD-Medium auf eine Absorption bei 600 nm (OD_{600}) von ca. 0,2 verdünnt und bis zur zweifachen Verdopplung bei 30 °C unter konstantem Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert (4.000 g, 5 min), mit 25 mL und 1 mL ddH₂O gewaschen und in $(100(n+1))$ µL ddH₂O resuspendiert, wobei n der Anzahl an durchgeführten Transformationen entsprach. Hiervon wurden 100 µL je Transformation mit 240 µL 50 % (V/V) PEG 3500, 36 µL 1 M Lithiumacetat, 50 µL einzelsträngige Träger-DNA aus Lachssperma (denaturiert für 5 min bei 95 °C), 34 µL ddH₂O sowie 0,6-2 µL der jeweiligen Plasmid-Lösung versetzt, durch vortexen gemischt und für 45-60 min bei 42 °C inkubiert. Die Plasmidmenge variierte mit dem verwendeten Hefestamm, wobei für BY-Linien (2.5) stets mehr DNA benötigt wurde, um adäquates Wachstum zu erzielen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (14.000 g, 30 s) gesammelt und in 1 mL ddH₂O resuspendiert. 100 µL einer 1:(25-100) Verdünnung der resuspendiert Zellen wurden auf dem Genotyp entsprechendem festen SD-Medium (2.5) mit entsprechenden Zusätzen verteilt und für mindestens vier Tage bei 30 °C inkubiert. Diese Hefekulturen wurden bis zu acht Wochen bei 4 °C mit Parafilm verschlossen gelagert. Dauerkulturen wurden aus einer 5 mL Übernachtskultur angelegt. Diese wurden 1:2 mit 80 % Glycerol versetzt, durch Vortexen gemischt und bei -80 °C gelagert und bei Bedarf wieder auf festem Medium angezogen. Dauerkulturen wurden nicht für biologische Replikate verwendet.

2.10 Membranproteinisolation aus *S. cerevisiae*

Puffer B		Puffer M	
25 mM	Tris-HCl, pH 7,5	100 mM	Natriumdihydrogenphosphat, pH 8,0
5 mM	EDTA	50 mM	NaCl

4x-SDS-Ladepuffer	
250 mM	Tris-HCl, pH 6,8
40 % (V/V)	Glycerol
0,02 % (m/V)	Bromphenolblau
8 % (m/V)	Natriumlaurylsulfat (SDS)
100 mM	Dithiothreitol

Von den Hefen auf festem Selektionsagar wurde zur Membranisolation eine Kolonie isoliert und in 5 mL SD-Medium überführt und ca. 24 h bei 30 °C unter konstantem Schütteln inkubiert (Vorkultur). Hiervon wurden 0,2-5 mL in 50 mL SD-Medium überführt und bis zu einer OD_{600} von 0,8-1 bei 30 °C unter konstantem

Material und Methoden

SDS-PAGE, Coomassiefärbung und Western-Blot

Schütteln inkubiert. Die Zellen der Kultur wurden pelletiert (4.000 g, 5 min, 4 °C), mit ddH₂O und 10 mL Puffer B gewaschen und für mindestens 12 h bei -80 °C eingefroren. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, in 500 µL Puffer B resuspendiert und mit 0,5 g säuregewaschenen Glaskugeln versetzt und mindestens zehnmal für 30 s gevortext. Zwischen jedem Vortexen wurden die Zellen 1 min auf Eis gehalten. Die Glaskugeln wurden durch Zentrifugation (2.000 g, 5 min, 4 °C) entfernt, und die Prozedur wiederholt. Die Überstände wurden vereint. Anschließend wurden Zelltrümmer entfernt (10.000 g, 5 min, 4 °C) und die mikrosomale Fraktion durch Ultrazentrifugation (100.000 g, 40 min, 4 °C) gewonnen und in 100 µL Puffer M resuspendiert. Die Konzentration wurde mittels Bio-Rad Protein Assay ermittelt. Hierzu wurden 1-5 µL der Proteinlösung ad 800 µL mit ddH₂O verdünnt und mit 200 µL Bradford-Reagens gemischt. Nach Inkubation für mindestens 5 min bei RT wurde die Absorption der Probe bei 595 nm gemessen. Als Standard dienen Rinderserumalbumin-Lösungen bekannter Konzentration. Das restliche Isolat wurde 1:4 mit 4x-SDS-Ladepuffer versetzt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.11 SDS-PAGE, Coomassiefärbung und *Western-Blot*

<u>4x-Sammelgelpuffer</u>	<u>4x-Trenngelpuffer</u>	<u>Kathodenpuffer</u>
0,5 M Tris-HCl, pH 8,8	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 mM Tris
0,4 % SDS (m/V)	0,4 % SDS (m/V)	19,2 mM L-Glycin
		0,1 % SDS
		<u>pH 8,2-8,8</u>

Die Trennung der isolierten Proteine (2.10) nach der Größe erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Zwischen zwei Glasplatten wurden hierzu Trenngele mit abschließenden Sammelgelen gegossen (Tabelle 5). In das Sammelgel wurden mit Hilfe eines Plastikammes bis zu 12 Geltaschen ausgespart. Die so erhaltenen Gele wurden bis zu einer Woche bei 4 °C gelagert und zur Verwendung in eine Laufapparatur eingespannt, die mit Kathodenpuffer befüllt war.

Mit 4xSDS-Ladepuffer versetzte Proben wurden für 30 min bei 37 °C oder 10 min bei 60 °C inkubiert und anschließend in die Geltaschen gefüllt, wobei 10-15 µg Gesamtproteinmasse verwendet wurden. Zusätzlich wurde als Standard zum Größenvergleich der *peqGold Prestained Protein Marker III* in eine der Geltaschen gefüllt. Die Fokussierung der Proben im Sammelgel erfolgte durch

Material und Methoden

SDS-PAGE, Coomassiefärbung und Western-Blot

Anlegen einer Spannung von 160 V für 15 min und die Trennung erfolgte durch Erhöhung der Spannung auf 200 V für mindestens 1 h. Die getrennten Proben wurden anschließend im Gel mit Coomassie®-R unspezifisch gefärbt oder für den spezifischen Nachweis einzelner Proteine mittels Western-Blot auf eine Membran übertragen.

Tabelle 5: Zusammensetzung eines Gels für die SDS-PAGE.

Trenngel /mL	Sammelgel /mL	Reagens
5,25	2,4	ddH ₂ O
3	1	entsprechender 4x-Gelpuffer
3,75	0,6	Acrylamid, Rotiphorese® Gel 40
0,01	0,006	TEMED
0,08	0,025	10 % Ammoniumpersulfat

Die Coomassiefärbung erfolgte durch Inkubation mit Rotiphorese®-Blau-R-Lösung, verdünnt nach Herstellerangaben, für 1 h bei RT unter konstantem Schütteln. Überschüssiger Farbstoff wurde durch 1 h in essigsauerm Ethanol (30 % (V/V)) und ca. 18 h in ddH₂O entfernt.

5x-Transferpuffer		1x-Transferpuffer	
125 mM	Tris-HCl, pH 8,3	10 mL	5x Transferpuffer
960 mM	Glycin	10 ml	Methanol
0,2 % (m/V)	SDS	ad 50 ml	ddH ₂ O

10x-TBS		TBST		MTBST	
0,2 M	Tris-HCl pH 7,6	100 mL	10x-TBS	1,5 g	Milchpulver
1,35 M	NaCl	1 ml	TWEEN20®	ad 50 mL	TBST
		ad 1 L	ddH ₂ O		

Für einen Western-Blot wurden mittels *semi-dry* Elektrotransfer die getrennten Membranproteinisolate aus den Polyacrylamid-Gelen auf eine PVDF-Membran übertragen. Diese wurde durch Inkubation von 20-60 s in Methanol aktiviert und mit dem Gel zwischen je drei in Transferpuffer getränkte Whatman® Chromatographie Filterpapiere gelegt. Anschließend wurde der gesamte Aufbau zwischen zwei Elektroden platziert. Dies erfolgte so, dass die Proben Richtung Anode auf die PVDF-Membran fixiert werden konnten. Hierzu wurde für 1 h eine Spannung von 17 V angelegt.

Die Membran wurde dann für 1 h bei RT unter konstantem Schütteln in MTBST und anschließend über Nacht mit dem primären Antikörper aus der Maus (1:5000

in MTBST) bei 4 °C unter konstantem Schütteln inkubiert und anschließend dreimal für je 15 min mit MTBST unter konstantem Schütteln bei RT gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper Anti-Maus aus der Ziege gekoppelt an Meerrettichperoxidase (HRP) (1:5000, in MTBST) für 1 h bei RT unter konstantem Schütteln. Die Membran wurde anschließend erneut dreimal für je 15 min mit MTBST unter konstantem Schütteln bei RT gewaschen. Die Lagerung der Membran bis zur Entwicklung erfolgte für max. 3 h bei 4 °C. Hierzu wurde eine Chemilumineszenz durch das HRP-Konjugat mit dem Amersahm-ECL-Plus Reagens-Kit erzeugt und diese im ChemoStar *Touch* ECL und *Fluorescence Imager* detektiert. Die Detektion der emittierten Strahlung erfolgte für unterschiedliche Belichtungszeiten, angepasst an das Signal von Wildtyp und Hefen die lediglich mit Leerplasmid transformiert waren. Das erhaltene Bild wurde auf ein optimales Kontrast- und Helligkeitsverhältnis mittels ImageJ (Rasband, 1997-2018) angepasst.

2.12 Mikroskopie

Zur Kontrolle der Zellgröße der Hefen wurde eine 5-mL-Vorkultur gesammelt (4 min, 6.000 g) und mit 1 mL ddH₂O gewaschen. Die Zelldichte wurde auf OD₆₀₀ = 1 eingestellt und die Zellen bis zur Beobachtung auf Eis gelagert. 10 µL dieser Suspension wurden in eine Zählkammer gegeben, mit einem Glasplättchen abgedeckt und unter Durchlicht bewertet.

2.13 Bestimmung der Generationszeit von *S. cerevisiae* nach Transformation

Die Generationszeit der jeweiligen Hefen wurde aus der OD₆₀₀ einer Kultur zu zwei Zeitpunkten berechnet. Hierzu wurden alle zu vergleichenden Zellen auf dieselbe Ausgangs-OD₆₀₀ verdünnt und nach einem definiertem Zeitintervall erneut die OD₆₀₀ bestimmt. Es wurde exponentielles Wachstum angenommen und Formel 2 verwendet.

$$t_{\text{gen}} = \frac{\Delta t}{\log_2 \frac{OD_{600,t_{\text{end}}}}{OD_{600,t_0}}} \quad (2)$$

wobei:

Δt = Wachstumsdauer /h

t_{gen} = Generationszeit /h

OD_{600,t_0} = Absorption der Zellkultur bei 600 nm zum Startpunkt der Messung /h

$OD_{600,t_{\text{end}}}$ = Absorption der Zellkultur bei 600 nm zum Messzeitpunkt /h

2.14 Radio-Assay in der Hefe

Messpuffer

pH 3,8-4,8	pH 4,9-5,8	pH 5,9-7,3
50 mM Zitronensäure	50 mM MES	50 mM HEPES
50 mM Tris-HCl	50 mM Tris-HCl	50 mM Tris-HCl

gewünschten pH mit HCl und NaOH einstellen

sterilfiltrieren

Lyonium-Ionen-Puffer

H ₂ O			D ₂ O			Puffersubstanz /mL
pH	pH	pH	pD	pD	pD	
4,8	5,8	6,8	4,8	5,8	6,8	
4,50	2,92	7,90	4,50	2,92	7,90	0,2 M Na ₂ H/DPO ₄
6,13	4,54	4,00	6,13	4,54	4,00	0,1 M Zitronensäure
pH einstellen (HCl, NaOH)			pD mit Elektrode bestätigen			

¹⁴C-Substratpuffer

1-10 mM Gradient	10-100 mM Gradient	100-200 mM Gradient	radiomarkiertes Substrat (55-57 Ci/mol) Substrat, Natriumsalz
0,002 µCi/µL	0,004 µCi/µL	0,006 µCi/µL	
5-20 mM	50-500 mM	500-1000 mM	

im jeweiligen Messpuffer verdünnen

Zellen, die mit dem gewünschten Konstrukt transformiert waren (2.9), wurden als Einzelkolonie von festem Medium isoliert und in 5 mL als Vorkultur angezogen. Hiervon wurden 70 µL in 5 mL überführt und erneut über Nacht angezogen. Diese Kultur wurde unter Berücksichtigung der Generationszeit (2.13) schließlich so in ausreichend flüssigem Medium (40-200 mL) verdünnt, dass am nächsten Tag eine Kultur mit OD_{600} von $1,0 \pm 0,05$ erhalten wurde. Die Inkubation der Kulturen erfolgte

bei 30 °C unter konstantem Schütteln. Sie wurden pelletiert (4.000 g, 5 min, 4 °C), mit 50 mL ddH₂O gewaschen und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Zur Untersuchung wurden die Zellpellets im gewünschten Messpuffer so resuspendiert, dass eine OD₆₀₀ von 50 ± 5 gemessen wurde. 80 µL der jeweiligen Hefesuspension, die durchschnittlich 5,6 mg Hefe enthielten (Köpnick *et al.*, 2021), wurden aliquotiert, gevortext und für ca. 2 min bei der gewünschten Temperatur (4-19 °C; auf Eis, bei RT oder im Kühlschrank) inkubiert. Anschließend wurden sie mit 20 µL des jeweiligen Substratpuffers versetzt, wodurch ein zum Zellinneren hin gerichteter Substrat-Gradient resultierte. Substratpuffer wurden stets in der fünffachen Messkonzentration mit Substrat angesetzt, so dass beim Mischen mit der Hefesuspension der gewünschte Gradient resultierte. Für alle Messungen außer für Michaelis-Menten-Messungen wurde ein Gradient von 1 mM angelegt. Nach einem exakt definierten Zeitintervall wurde die Substrataufnahme durch Mischen der Probe mit 1 mL eiskaltem ddH₂O gestoppt. Die Probe wurde anschließend sofort auf einen 2,2 µm Whatman® Borosilicatfilter gegeben, welcher an eine Vakuumpumpe geschaltet war, wodurch überschüssiger Puffer und nicht aufgenommenes Substrat abgesaugt wurden. Die Hefezellen verblieben dabei auf dem Filter und wurden mit 6-7 mL eiskaltem ddH₂O gewaschen. Die Filter wurden für mindestens 12 h in je 3 mL Szintillationscocktail (Quicksafe A oder Rotiszint) inkubiert und das Hefepellet so lysiert. Zusätzlich wurden 10-20 µL Substratpuffer direkt in 3 mL Szintillationscocktail überführt und als Referenz zur Bestimmung der aufgenommenen Substratmenge vermessen. Je Messpunkt wurden biologische Replikate (N) aus zwei oder drei technischen Replikaten durchgeführt. Um den Hintergrund von am Filter haftenden Substrat zu berücksichtigen, wurde der gemessene Wert für 10 s von Hefen die mit Leerplasmid transformiert waren (–) von allen Werten abgezogen.

2.14.1 Durchführung in der *batch*-Methode

Efflux-Messungen wurden mittels *batch*-Methode durchgeführt. Für diese wurden bis zu sechs Aliquote à 80 µL der Hefesuspension in ein Gefäß vorgelegt und mit Substratpuffer 1:5 inkubiert, wobei die Dauer hierfür den beobachteten Transportraten der Proteine angepasst wurde, um ca. die gleiche Beladung der Zellen zu erzielen. Für hMCT1 und hAQP9 wurde zudem der Beladungs-pH auf 3,8 gesenkt, um mehr Substrat in die Hefen zu laden. Die Zellen wurden

anschließend pelletiert (15 s, 12.225 g) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in Messpuffer resuspendiert und so der Substratgradient nach außen gerichtet. Hiervon wurden zum indizierten Zeitpunkt 100 µL abgenommen wie beschreiben gesammelt und ausgezählt. So konnte mit dem zurückgehaltenen Hefepellet die verbleibende Substratmenge in den Hefezellen bestimmt werden. Als Startpunkt wurde ein Aliquot vor dem Pelletieren entnommen. Es wurden stets technische Duplikate angefertigt.

2.14.2 Durchführung im 96-*well*-Platten-Format

Zur zeitsparenden, parallelen Durchführung mehrere Messungen wurde der Assay auf ein 96-*well*-Format übertragen. Hierfür wurden opaque *Multiscreen-HTS 96-HV-Filter-Plates* verwendet, die auf eine entsprechende Absaugeinheit (MultiScreenHTS *Vacuum Manifold*) gelegt wurden. In die Filter-*wells* wurden direkt 80 µL Hefesuspension vorgelegt. Mit Hilfe einer 8-Kanal-Pipette konnten bis zu acht Messungen gleichzeitig durch Zugabe von Substratpuffer gestartet werden. Hierbei war die Menge markierten ¹⁴C-Substrates verdoppelt gegenüber dem klassischen Assay. Die Aufnahme in die Zellen wurde zum gewünschten Zeitpunkt durch Öffnen des Vakuums und folgliches Absaugen des Substratpuffers unterbunden. Es wurde dreimal mit 200 µL kaltem ddH₂O gewaschen. Durch zeitlich versetztes Zugeben des Substratpuffers konnten so bis zu 96 Reaktionen gleichzeitig gestoppt werden.

Die verbliebenen Hefepellets wurden über Nacht mit je 200 µL Szintillationscocktail (Microscint-20) unter Schütteln bei RT inkubiert. Der Substratpuffer wurde separat in einer handelsüblichen, durchsichtigen 96-*well*-Platte mit 200 µL Szintillationscocktail als Referenz vermessen. Das Auszählen der Aktivität erfolgte in einem Platten-*liquid-scintillation-Counter* (MicroBeta Trilux) mit *cross-talk-correction*, die für den Assay eingelesen wurde. Hierbei war auffällig, dass die aufgenommene Substratmenge sich stets zum Standard-Einzel-Filter-Assay unterschied, da das Zellepellet nicht komplett lysiert werden konnte und der Counter weniger sensitiv war. Es wurde ein Faktor von 3,15 durch Vergleich aller gemessenen Konstrukte bei pH 6,8 bestimmt und die Ergebnisse damit multipliziert, um die Vergleichbarkeit der Assays zu gewährleisten.

2.15 Generierung von Protoplasten aus *S. cerevisiae*

Protoplastenpuffer		
I	II	III
50 mM MOPS pH 7,2	50 mM MOPS pH 7,2 1,2 M Saccharose	50 mM NaCl 1,2 M Saccharose 5 mM CaCl ₂ 10 mM MOPS pH 7,2 (10 mM Monocarboxylat)
autoklavieren	partikelfrei filtrieren	partikelfrei filtrieren
+ 0,2 % β-Mercaptoethanol am Versuchstag		

S. cerevisiae-Zellen wurden wie beschrieben (2.9) mit dem gewünschten Konstrukt transformiert und eine Kolonie wurde vom festen SD-Medium isoliert und als Vorkultur angezogen. Diese Vorkultur wurde so in 50 mL verdünnt und bei 30 °C unter konstantem Schütteln inkubiert, dass am Folgetag eine OD₆₀₀ von 0,9-1,1 resultierte. Die Zellen wurden pelletiert (4.000 g, 5 min, 4 °C), in 3 mL Puffer I gewaschen und das möglichst trockene Pellet gewogen. Nach Zugabe von 2 mL Puffer I und konstantem Schütteln (140 Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute* (rpm))) für 15 min bei 30 °C wurden die Zellen mit 30 U/g Zymolyase und 100 mg Rinderserumalbumin in ad 4 mL Puffer II für 1 h unter konstantem Schütteln (140 rpm) bei 30 °C inkubiert um die Zellwand der Hefen zu verdauen. Die so gewonnenen Protoplasten wurden gesammelt (2.000 g, 5 min, 4 °C), mit 5 mL Puffer III gewaschen und in Puffer III resuspendiert, so dass eine OD₆₀₀ von 2 resultierte. Die Protoplasten wurden bis zur Verwendung für max. 48 h bei 4 °C gelagert.

Für Experimente zur Inhibition der Wasserleitfähigkeit wurden Protoplasten in Puffer III mit 10 mM entsprechendem Monocarboxylat-Zusatz (Natrium-Formiat, Natrium-Acetat oder Natrium-Propionat) resuspendiert, so dass eine OD₆₀₀ von 2 resultierte und 24 h über Nacht bei 4 °C inkubiert.

2.16 Stopped-Flow-Assays

Puffer IV					
300 mM hypoton		300 mM hyperton		Δ pH = 1	
50 mM	NaCl	50 mM	NaCl	50 mM	NaCl
0,6 M	Saccharose	1,8 M	Saccharose	1,2 M	Saccharose
5 mM	CaCl ₂	5 mM	CaCl ₂	5 mM	CaCl ₂
10 mM	MOPS pH 7,2	10 mM	MOPS pH 7,2	50 mM	MOPS pH 5,2
partikelfrei filtrieren					

2.16.1 Schwell- und Schrumpf-Assay zur Wasserleitfähigkeit

Die Messung zur Wasserleitfähigkeit erfolgte mittels flussunterbrochener Analyse (*Stopped-Flow-Methode*). Die Messbedingungen wurden wie in Tabelle 6 beschrieben eingestellt. Protoplasten, suspendiert in Puffer III, wurden im Verhältnis 1:1 mit dem gewünschten Puffer IV in der Küvette der *stopped-flow* Apparatur vermischt und die Intensität des Streulichtes im 90°-Winkel über 12 s gemessen. Je Konstrukt wurden für ein biologisches Replikat sechs bis zwölf technische Replikate vermessen.

Tabelle 6: Eingestellte Messparameter für die *Stopped-flow*-Messung zur Wasserleitfähigkeit.

variabler Parameter	Einstellung
Xe/Hg-Bogenlampe	100 W
Monochromator	524 nm
<i>Output</i> -Filter	300 μ s
Photomultiplier	600-800 x
Temperatur der Küvette	20 °C
Injektionsvolumen je Probe	75 μ L
Injektionsgeschwindigkeit je Probe	4 mL \cdot s ⁻¹
Messdauer	12 s
Messintervall	5 ms
erwartet Totzeit	2,7 ms

Es wurden bis zu neun Messungen gemittelt, wobei Messungen, die Störsignale zeigten, manuell selektiert und verworfen wurden. Die resultierende gemittelte Kurve wurde zur Auswertung verwendet. Der Startpunkt der Kurve (0,02-0,05 s) wurde auf (0|0) verlegt und die Kurve durch Multiplikation mit dem Kehrwert der maximalen Signalstärke normiert. Die erhaltene Kurve wurde mit der *BioKine-Software* nach Formel (3) einfach exponentiell gefittet und der τ -Wert an ($x = 1 - e^{-1}$) direkt abgelesen. Zur Darstellung wurden die Datenpunkte um den Faktor 2 reduziert.

$$f(t) = 1 - e^{-kt} \tag{3}$$

wobei:

k = Ratenkonstante des Wassertransports in s⁻¹,

t = Zeitpunkt der Messung in s

2.16.2 Fluoreszenz-Assay zur Protonenleitfähigkeit

S. cerevisiae-Zellen wurden vor Protoplastierung pelletiert (4.000 g, 5 min, 4 °C) und mit 10 mL 50 mM MOPS pH 7,2 gewaschen. Sie wurden in 50 mL 50 mM MOPS pH 7,2 mit 100 µM Carboxyfluorescein (6-FAM) resuspendiert und für 24 h bei 37 °C unter konstantem Schütteln mit dem Fluoreszenzindikator beladen. Die inzwischen orangenen Hefezellen wurden pelletiert (4.000 g, 5 min, 4 °C), ein- bis zweimal mit 10 mL 50 mM MOPS pH 7,2 gewaschen, protoplastiert (2.15) und auf eine OD₆₀₀ von 2 eingestellt. Hierbei wurden die Hefen stets vor Licht geschützt, indem alle Gefäße blickdicht mit Alufolie umwickelt waren. Die Messung der Protonenleitfähigkeit erfolgte in einer *stopped-flow*-Apparatur mit Messbedingungen wie in Tabelle 7 beschrieben.

Tabelle 7: Eingestellte Messparameter für die *stopped-flow*-Messung zur Protonenleitfähigkeit.

variabler Parameter	Einstellung
Xe/Hg-Bogenlampe	100 W
Monochromator	495 nm
<i>Output</i> -Filter	300 µs
Detektor <i>cutoff</i>	>500 nm
Photomultiplier	700-800 x
Temperatur der Küvette	20 °C
Injektionsvolumen je Probe	75 µL
Injektionsgeschwindigkeit je Probe	4 mL · s ⁻¹
Messdauer	12-60 s
Messintervall	1-20 ms
erwartet Totzeit	2,7 ms

Beladene Protoplasten, suspendiert in Puffer III, wurden im Verhältnis 1:1 mit isoosmotischem Puffer IV ($\Delta\text{pH} = 1$) in der Küvette der *stopped-flow* Apparatur vermischt. Es resultierte ein zum Zellinneren gerichteter pH-Gradient gegenüber dem Zellinneren von 1 (mit pH-Elektrode bestätigt durch Mischen von Puffer III und IV). Je Konstrukt wurden sechs bis zwölf Replikate vermessen und analog des Schwell- und Schrumpfassays ausgewertet. Die erhaltene Kurve wurde mit der BioKine Software nach Formel (3) im Zeitraum bis 1 s einfach exponentiell gefittet und die Rate ermittelt.

2.17 Methylamin-Assays

Methylamin-Medium	
Lösung 1	Lösung 2
0,17 % (w/w) YNB	20 ml MES (pH 5,5) oder MOPS (pH 7,5) 2 % Oxoid Agar
2 % (w/w) Glucose	
50 mM 40 % Methylamin	
0,1 % (V/V) L-Prolin	
0,2 % (V/V) L-Lysin	
0,2 % (V/V) L-Leucin	
pH 5,5 oder 7,5 (HCl), sterilfiltrieren, temperieren auf 50 °C	autoklavieren
Lösung 1 und 2 in gleichen Teilen mischen und vor dem Aushärten in Platten gießen.	

S. cerevisiae-Zellen wurden wie beschrieben (2.9) mit dem gewünschten Konstrukt transformiert, eine Vorkultur in 1,5 mL SD-Medium angezogen. Die Zellen wurden pelletiert (13.000 g, 30 s), in 1 ml ddH₂O gewaschen und auf eine OD₆₀₀ von 1 ± 0,05 verdünnt. Hiervon wurden je Konstrukt drei serielle 1:10-Verdünnungen durchgeführt und von jeder Verdünnung 10 µL auf festem Selektions- sowie dem SD-Kontroll-Agar ausplattiert. Die Platte wurde offen unter der *laminar-flow*-Werkbank gelagert, bis alle Flüssigkeit in den Agar eingezogen oder verdampft war. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und für bis zu 14 Tage bei 30 °C inkubiert. Das Koloniewachstum wurde mit dem ChemoStar Touch ECL und *Fluorescence Imager* festgehalten (*Expert-Mode*).

2.18 *In-silico*-Modellierungen und -Berechnungen

Insofern nicht anders angegeben, wurden zur Darstellung von Proteinen die PDB-Strukturen aus Tabelle 8 verwendet.

Tabelle 8: Zur Darstellung von Proteinen verwendete PDB-Strukturen.

Protein	PDB-Nummer
EcFocA	3KCU
PfFNT	7E27
EcAmtB	1U77
EcGlpF	1FX8

Zur Darstellung der Veränderung der Porengröße nach zielgerichteter Mutation wurde mit Hilfe von PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4.1, Schrödinger, LLC) und Chimera (Version 1.14, Pettersen *et al.*, 2004) das resultierende Protein simuliert. Durch den *Mutagenesis*-Wizard in PyMol wurde

Material und Methoden

In-silico-Modellierungen und -Berechnungen

die gewünschte Mutation an der starren Struktur generiert und das Rotamer mit der geringsten sterischen Hinderung gewählt. Der lösungsmittelzugängliche Raum wurde als *cavities and pockets only (culled)* dargestellt. Der Lösungsmittelradius betrug 1,4 Å.

Die so generierte Struktur wurde dann als Molfile-Datei gespeichert, um sie in Chimera zu importieren. Es wurde eine Ebene durch die C α -Atome der konstriktionsbildenden Aminosäuren gelegt, um den Querschnitt durch alle Proteinvarianten an derselben Stelle im Transportpfad darzustellen (Abbildung 2-1). Es wurde erneut die lösungsmittelzugängliche Oberfläche dargestellt, und das Molekül an der eingezogenen Ebene geschnitten. Die Fläche wurde durch Auszählen der Pixel des sichtbaren lösungsmittelzugänglichen Raumes mittels ImageJ (Rasband, 1997-2018) berechnet. Als Maßstab wurde die Dreiecksfläche zwischen den die Ebene definierenden C α -Atomen herangezogen.

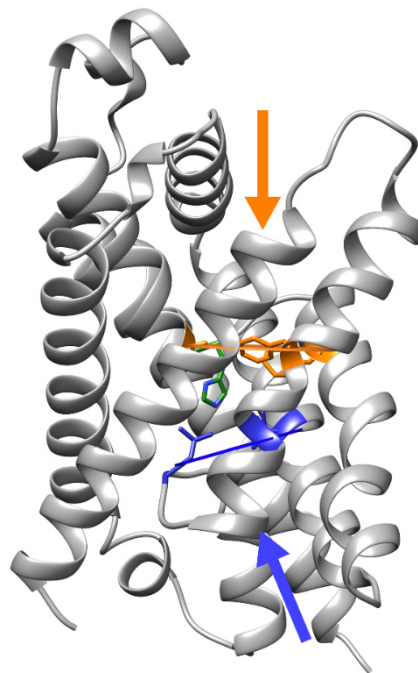


Abbildung 2-1: Zur Berechnung der Querschnittsfläche im jeweiligen FNT wurden durch die exoplasmatische (orange) und zytoplasmatische (blau) Konstriktion eine Ebene gelegt. Sie war jeweils durch die drei C α -Atome der konstriktionsbildenden Aminosäuren definiert und es wurde stets orthogonal (Pfeile) dazu die Fläche berechnet. Hierzu wurde Chimera verwendet. Exemplarisch für das EcFocA gezeigt.

Die Säurestärke des zentralen Histidins dieser modulierten Strukturen wurde mit Hilfe des DEPTH-Algorithmus in einer Wasserbox basierend auf dem SPC216 Wasser-Modell mit zwei benachbarten Wassermolekülen berechnet (Tan *et al.*, 2013). Hiermit wurden auch die DEPTH-Werte für den Abstand zum nächsten Wassermolekül berechnet. Die Anzahl der benachbarten Wassermoleküle wurde

manuell von 1-5 variiert, wobei der Solvensradius bei 4,2 Å lag und über 75 Zyklen solvatisiert wurde. Beides wurde für jedes Protomer berechnet, so dass die Angaben einen Mittelwert mit S.E.M. darstellen.

2.19 Alignment von Proteinsequenzen

Aminosäuresequenzen der alignen Sequenzen wurden aus diversen Datenbanken entnommen (GenBank, NCBI, uniProt, PlasmoDB) und über BLAST nach dem *maximal segment pair score* mithilfe des *Clustal Omega tools* (Sievers *et al.*, 2011; Sievers und Higgins, 2018) aneinander geordnet (Altschul *et al.*, 1990). Die Darstellung erfolgte mit TeXshade (Beitz, 2000) in Overleaf (Online-LaTeX-Editor).

2.20 Statistische Auswertung

Für alle Messungen sind Mittelwerte angegeben, die aus zwei bis drei technischen Replikaten generiert wurden. Es wurden meist mehrere biologische Replikate (N) angefertigt, die genaue Anzahl ist zum Experiment angegeben. Der Fehler beschreibt dann den Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.), für Einfachmessungen die Standardabweichung (S. D.) der technischen Replikate. Für aus Fittings abgeleitete Werte ist der Standardfehler des Fit-Parameters aus SigmaPlot angegeben.

Zur Kurvenanpassung (*fitting*) für zusammenhängende Messwerte wurde SigmaPlot verwendet (Version 11.0 und 14.5, Systat Software Inc.). Für beschränktes Wachstum wurde Formel (4) zu Grunde gelegt. Hieraus wurden Ratenkonstanten und maximale Aufnahmekapazitäten mit Standardfehler abgelesen. Initiale Transportraten wurden direkt aus einem Datenpunkt im linearen Bereich der Aufnahme, normiert auf eine Minute, berechnet. Für glockenförmige Kurvenverläufe wurde (5) verwendet, wobei die Variable x dem pH entsprach.

$$f(t) = y_0 + a \exp(-bt) \quad (4)$$

wobei:

y_0 = y-Achsenabschnitt (für Aufnahmekurven gilt $y_0 = 0$)
 a = Grenzwert (maximale Aufnahmekapazität) in nmol mg^{-1}
 b = Ratenkonstante in s^{-1}
 t = Zeitpunkt in s

$$f(t) = a \exp\left(-0,5 \left(\frac{x - x_0}{b}\right)^2\right) \quad (5)$$

wobei:

x_0 = Lage des Maximums
 a = Maximum der Kurve
 b = Ratenkonstante

Ein Ausreißertest nach Henning (Mittelwert $\pm 3s$) wurde bei Beobachtung von großen Fehlern ($>20\%$) für den je höchsten und niedrigsten Wert der Messreihe über alle Einzelmesswerte durchgeführt und so identifizierte Ausreißer nicht berücksichtigt. Zur Prüfung auf statistisch signifikante Unterschiede wurde über alle Einzelmessungen des Parameters zunächst auf Normalenverteilung nach David-Hartley-Pearson ($\alpha = 0,05$) und Varianzhomogenität mittels F-Test ($\alpha = 0,05$) geprüft und bei Erfüllung ein t-Test über alle Einzelmesswerte ($\alpha = 0,05$) durchgeführt. Wurde keine Normalverteilung festgestellt, wurde der Mann-Whitney-U-Test ($\alpha = 0,05$) verwendet. Wenn keine Varianzhomogenität beobachtet werden konnte, wurde der Welch-Test ($\alpha = 0,05$) verwendet.

3 | Ergebnisse

3.1 Bidirektionale Substratpassage durch konstriktionserweiterte FNT-Varianten bei pH 6,8

Zur Untersuchung der endogenen Funktion der hydrophoben Konstriktionen innerhalb des FNT-Transportpfades wurden durch *in-vitro* Mutagenese (2.8) 18 EcFocA-Varianten und vier PfFNT-Varianten mit erweiterten zyto- und exoplasmatischen Konstriktionen, mit moduliertem N-Terminus oder substituiertem zentralem Histidin generiert (2.8). Für alle Experimente zur Monocarboxylatpassage durch so veränderten FNT wurden Hefen der Linie W3031A Δ jen1 Δ ady2 mit für die entsprechenden Konstrukte kodierenden Plasmid-DNA transformiert. Diese Hefen wurden gewählt, da sie zwei *knock-outs* für endogene Monocarboxylattransporter aufweisen und so das Hintergrundsignal in Monocarboxylat-Passage-Assays geringhalten (Casal *et al.*, 1999).

Zunächst wurde eine Expressionskontrolle mittels Isolation der mikrosomalen Fraktion aus den entsprechend transformierten Hefen (2.10) und anschließender SDS-PAGE und Western-Blot-Analytik (2.11) durchgeführt. Hierbei konnten alle außer zwei der generierten Varianten mit dem verwendeten Anti-HA-Primärantikörper gerichtet gegen den N-terminal co-exprimierten HA-tag nachgewiesen werden (Abbildung 3-1). EcFocA-F75L und -L89A/F202A wurden so nicht detektiert, weshalb sie nicht für die durchgeführten Aufnahmeexperimente verwendet wurden. Nahezu gleiche Expressionsraten der verschiedenen Proteine konnten abgeschätzt werden, da das Gel stets mit derselben Gesamtproteinmasse beladen wurde (2.11). Um die so gleichmäßige Beladung zu überprüfen, wurde zudem einmalig ein SDS-PAGE-Gel mit getrennten Proben mit Coomassie unspezifisch gefärbt. Dieses zeigte grob dieselbe Intensität der erscheinenden Banden für alle Spuren und bekräftigte so die gleichmäßige Beladung und somit ähnliche Expressionslevel für alle untersuchten Konstrukte in diesem Hefestamm. Lediglich die EcFocA-F75V/F202V und -F75A/L79A sowie die PfFNT-G21E-Variante zeigten eine verminderte Bandenintensität und somit wohl eine niedrigere Expressionsrate (Abbildung 3-1). Es wurden zudem Abbruchfragmente des EcFocA und der als Kontrollen für Efflux-Experimente verwendeten Proteine hMCT1 und hAQP9 detektiert.

Ergebnisse

Bidirektionale Substratpassage durch konstriktionserweiterte FNT-Varianten bei pH 6,8

S. cerevisiae W3031A Δ jen1 Δ ady2

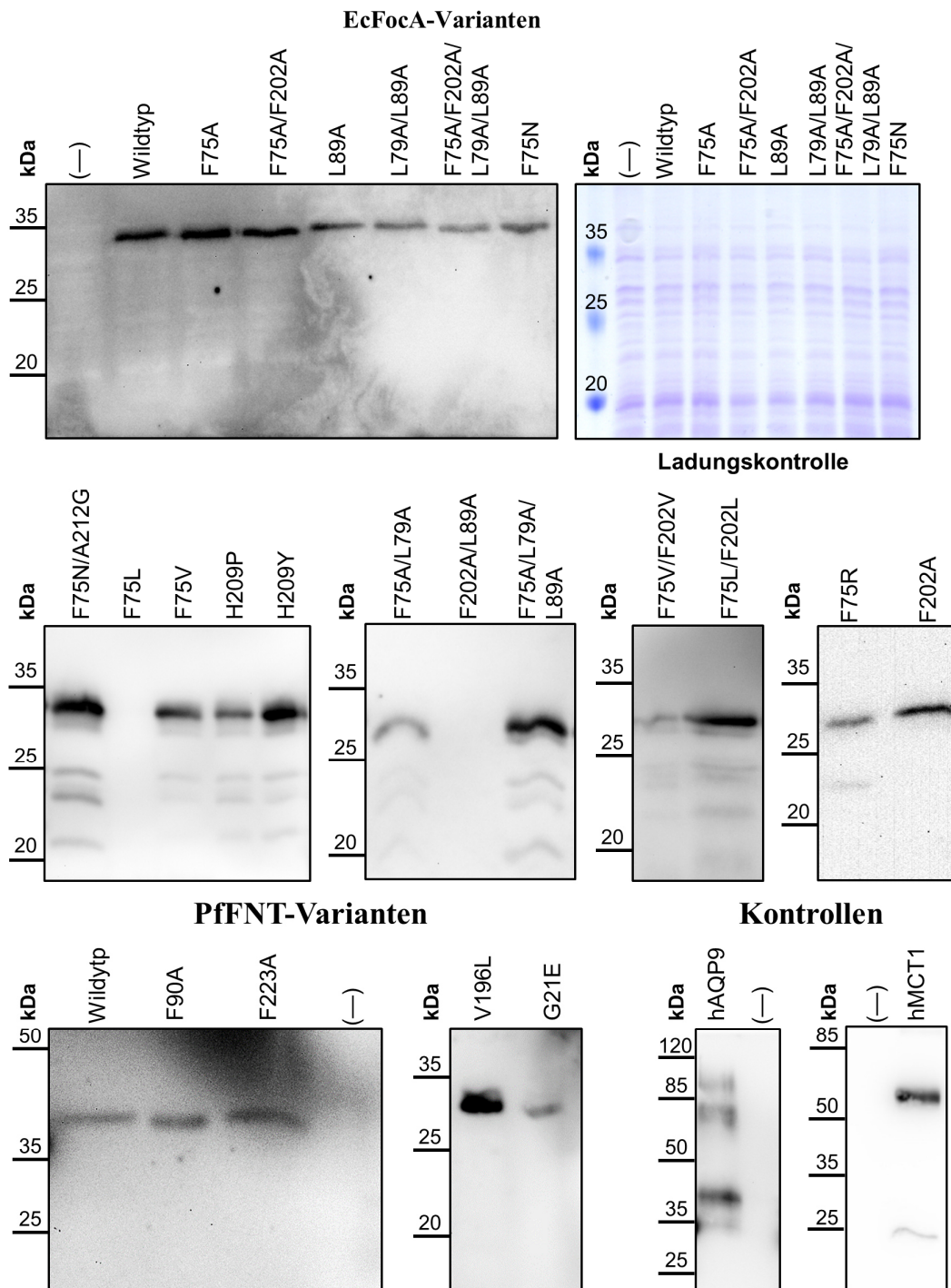


Abbildung 3-1: Western-Blots der mikrosomalen Fraktion eines Zellaufschlusses nach Transformation mit dem entsprechenden Konstrukt von *S. cerevisiae* der Linie W3031A Δ jen1 Δ ady2 nach Trennung per SDS-PAGE zur Expressionskontrolle der FNT-Varianten. Der Nachweis erfolgte durch Anti-HA-Primärantikörper und Anti-Penta-His-Primärantikörper (nur hMCT1). (-) zeigt den getrennten Aufschluss von Hefen, die mit Leerplasmid transformiert waren. Eine Coomassie-Ladungskontrolle (oben rechts) zeigt die gleichmäßige Beladung aller Geltaschen von ca. 10 μ g anhand einer vorausgehenden Bradford-Konzentrationsmessung des Zellaufschlusses.

Nach Transformation der Hefen mit den modulierten FNT-Konstrukten und Anwachsen auf festem Medium wurden die Hefekulturen in flüssiges Medium

Ergebnisse

Bidirektionale Substratpassage durch konstriktionserweiterte FNT-Varianten bei pH 6,8

übertragen und das Zellmaterial so für den jeweiligen Assay vervielfältigt (2.9). Hierbei fiel von Beginn an auf, dass die Hefen je nach Konstrukt, mit dem sie transformiert waren, unterschiedlich schnell wuchsen. So wurde für die für Monocarboxylat-Passage-Assays verwendeten Hefen die Generationszeit nach Transformation mit EcFocA-Konstrukten bestimmt (2.13, Abbildung 3-2).

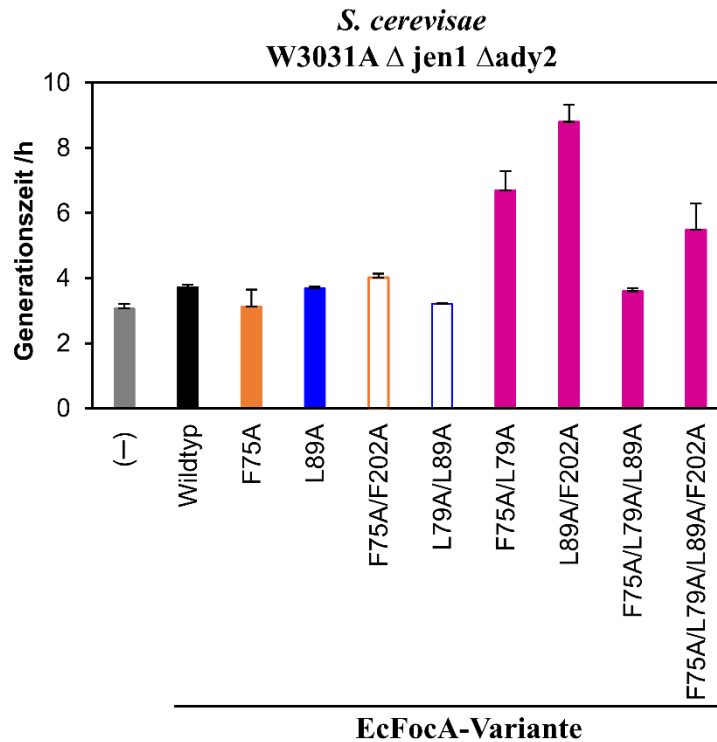


Abbildung 3-2: Generationszeiten der mit EcFocA-Varianten transformierten Hefen der Linie W3031A Δ ady1 Δ ady2. N = 3, Fehler stellen S.E.M. dar.

Hefen, die mit Leerplasmid transformiert waren, zeigten die kürzeste Generationszeit von ca. 3 h. Transformiert mit für den EcFocA-Wildtyp kodierendem Plasmid oder Einfach- und Doppelmutanten in einer Konstriktion zeigten die Hefen ähnliche Generationszeiten, wobei die F75A/F202A-Variante am langsamsten wuchs (t_{gen} von ca. 4 h). Von den Hefen, die EcFocA-Kreuz-Mutanten exprimierten, welche Mutationen in beiden Konstriktionen aufwiesen, wuchs lediglich die Dreifachmutante F75A/L79A/L89A noch ähnlich schnell. Hefen, die die Doppelmutanten F75A/L79A und die Quadrupelmutante F75A/L79A/L89A/F202A exprimierten, wiesen erheblich längere Generationszeiten auf (> 5 h). Die Variante mit der höchsten Generationszeit war die EcFocA-Doppelmutante L89A/F202A (> 8 h), dessen Expression auch nicht nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3-1).

Ergebnisse

Bidirektionale Substratpassage durch konstriktionserweiterte FNT-Varianten bei pH 6,8

Die Hefen wurden zur Untersuchung auf die Passage von Monocarboxylaten und Glycerol durch das jeweilig exprimierten FNT mit einem Radio-Assay untersucht (2.14, Abbildung 3-3).

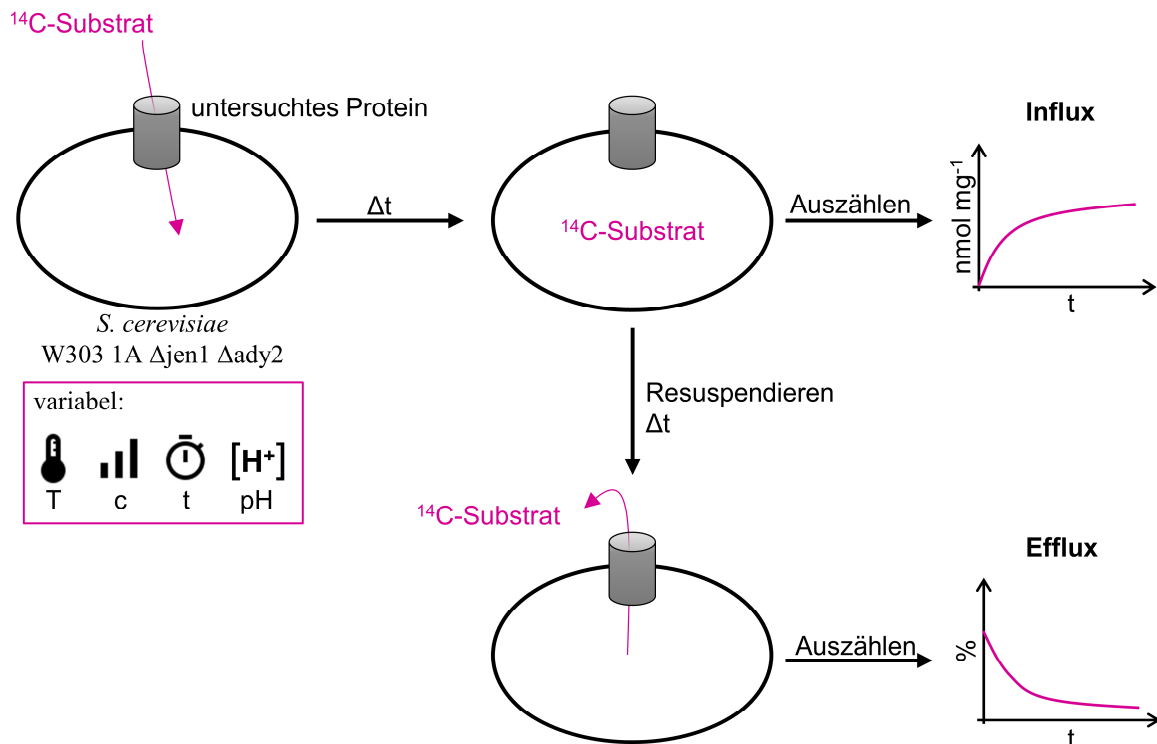


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung des Radio-Assays zur Messung von Influx und Efflux durch untersuchte Kanäle oder Transporter. Die verwendete Zelllinie W3031A Δ jen1 Δ ady2 weist keine endogenen Monocarboxylattransporter auf. Die Hefen wurden mit ^{14}C -markiertem Substrat inkubiert, anschließend pelletiert und die aufgenommene Substratmenge durch Auszählen der Aktivität im Hefepellet bestimmt (Influx). Für Efflux-Messungen wurde das Hefepellet in Puffer ohne Substrat resuspendiert, so der Substratgradient umgedreht wurde und Substrat ausströmen kann. Durch anschließendes Pelletieren und Auszählen wurde das in den Zellen verbleibende Substrat bestimmt. Dieser Assay konnte durch Veränderung von Temperatur (T), Substratkonzentration (c), Inkubationszeit (t) und pH variiert werden.

Um die Ausgangslage und die Funktionstüchtigkeit des Assays zu prüfen, wurden zunächst die Wildtyp-Proteine untersucht. Für Formiat durch EcFocA wurde eine maximale Aufnahmekapazität in die Hefe von $(0,10 \pm 0,01) \text{ nmol mg}^{-1}$ und für L-Laktat durch PfFNT von $(0,21 \pm 0,01) \text{ nmol mg}^{-1}$ beobachtet. Es ergaben sich initiale Transportraten von $(0,12 \pm 0,02) \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ für EcFocA und $(0,16 \pm 0,03) \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ für PfFNT (Abbildung 3-4). Mit diesen Werten wurde das Aufnahmeverhalten der generierten Mutanten verglichen, wobei im weiteren Verlauf das Hintergrundsignal zum jeweiligen Zeitpunkt der Messung direkt subtrahiert wurde.

Ergebnisse

Bidirektionale Substratpassage durch konstruktionserweiterte FNT-Varianten bei pH 6,8

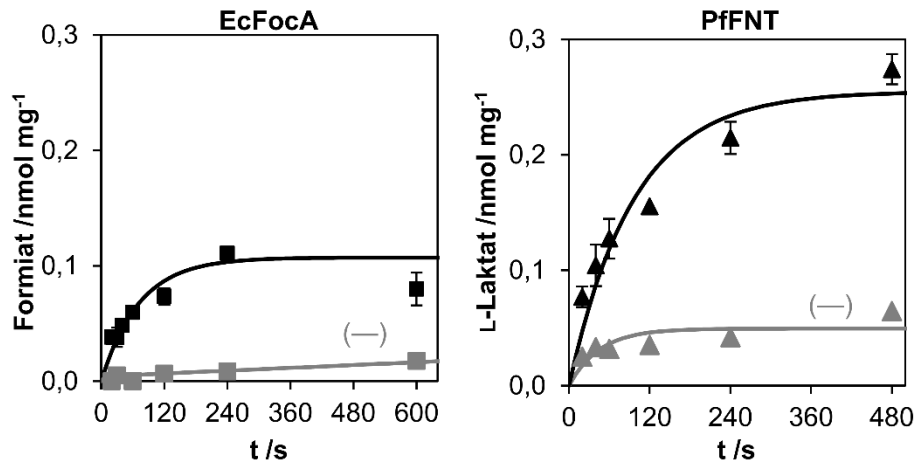


Abbildung 3-4: Zeitabhängige Formiat-Aufnahme bei pH 6,8 durch Wildtyp-EcFocA (links, Quadrate) und L-Laktat über Wildtyp-PfFNT (rechts, Dreiecke) sowie zugehöriges Hintergrundsignal (---) von Hefen die mit Leerplasmid transformiert wurden. $N \geq 3$, Fehler stellen S.E.M. dar.

3.1.1 Erweiterung der exoplasmatischen Konstriktion

Zunächst wurde die exoplasmatische Konstriktion des EcFocA näher untersucht. Hierfür wurden Mutanten der Phenylalanine an Position 75 und 202 herangezogen (Abbildung 3-1). Die F75A-Variante lieferte eine gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöhte Aufnahmekapazität von $(0,17 \pm 0,02)$ nmol mg⁻¹ für Formiat in die Hefe mit ebenfalls erhöhter initialer Transportrate von $(0,21 \pm 0,03)$ nmol mg⁻¹ min⁻¹ (Abbildung 3-5). Eine einfache Alanin-Substitution an Position 202 hingegen führte zum Verlust der Substratpassage über das modulierte EcFocA (Abbildung 3-5). Deshalb wurde zunächst nur die Position 75 durch weitere Substitutionen näher untersucht.

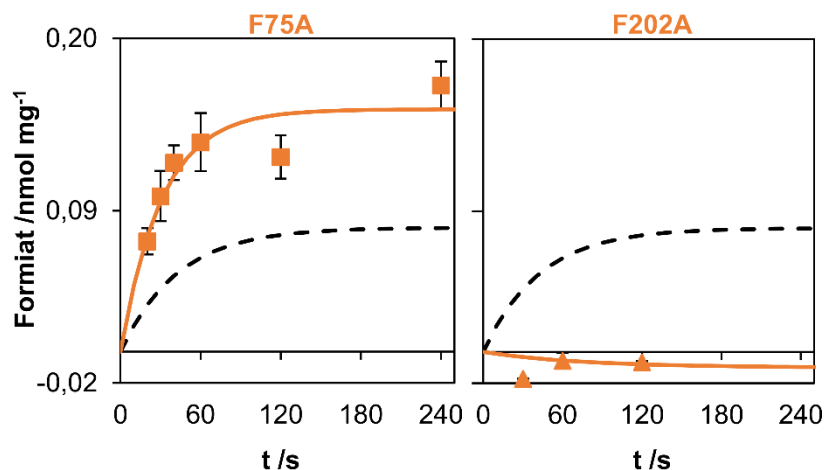


Abbildung 3-5: Zeitabhängige Formiat-Aufnahme bei pH 6,8 durch die EcFocA-Varianten F75A (links, Quadrate, $N = 3$) und F202A (rechts, Dreiecke, $N = 1-2$). Der Kurvenverlauf des Wildtyps ist schwarz-gestrichelt eingezeichnet. Das Hintergrundsignal wurde abgezogen, Fehler stellen S.E.M. dar.

Ergebnisse

Bidirektionale Substratpassage durch konstriktionserweiterte FNT-Varianten bei pH 6,8

Eine Mutation zum Asparagin an Position 75 war angelehnt an das EhFNT, welches im Vergleich zu den meisten FNT kein zentrales Histidin aufweist (Helmstetter *et al.*, 2019). Die F75N-Variante zeigte eine wildtypähnliche initiale Transportrate von $(0,11 \pm 0,01) \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ und maximale Aufnahmekapazität von $(0,075 \pm 0,01) \text{ mol mg}^{-1}$ (Abbildung 3-6). Das Asparagin mit polarem aber deutlich voluminöserem Rest als der Alanin-Substitution, das auch bei manchen FNT natürlicherweise vorkommt, zeigte also keine Änderung der im Aufnahmeverhalten bei neutralem pH.

Eine weitere generierte Variante trug ein Arginin mit positiver Ladung an Position 75. Diese F75R-Variante zeigte eine deutlich verminderte initiale Transportrate $(0,015 \pm 0,01) \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ und eine deutlich geringere absolute Aufnahme im Vergleich zum Wildtyp von $(0,044 \pm 0,03) \text{ nmol mg}^{-1}$ (Abbildung 3-6).

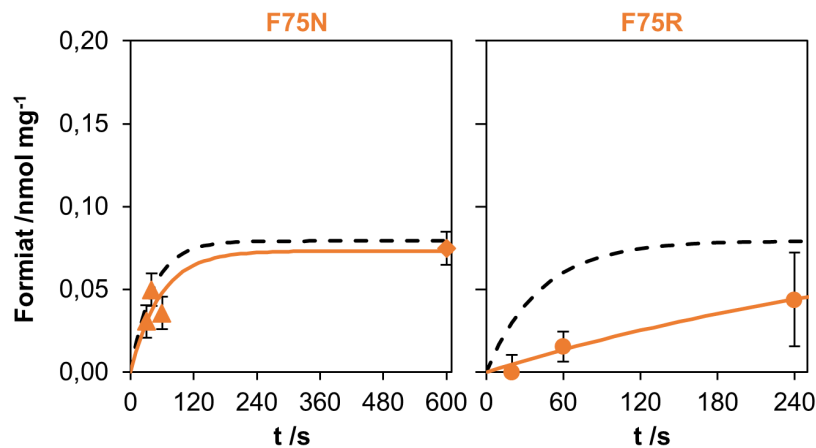


Abbildung 3-6: Zeitabhängige Formiat-Aufnahme bei pH 6,8 durch die EcFocA-Varianten F75N (links, Rauten, N = 2, Fehler stellen S.E.M) und F75R (rechts, Kreise, N = 1, Fehler stellt die S.D. dar). Der Kurvenverlauf des Wildtyps ist schwarz-gestrichelt eingezeichnet. Das Hintergrundsignal wurde abgezogen.

Zudem wurden eine Valin- und eine Leucin-Variante generiert, die analog der Alanin-Variante der Hydrophobizität des natürlichen Phenylalanins entsprachen, aber die Konstriktion erweiterten. So sollten Zwischenstufen der Porenerweiterung zwischen der F75A-Mutante und dem Wildtyp generiert werden. Die F75L-Variante wurde jedoch nicht in der Hefe exprimiert und so nicht näher charakterisiert (Abbildung 3-1). Die F75V-Variante zeigte eine zum Wildtyp nahezu identische initiale Transportrate von $(0,12 \pm 0,03) \text{ mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Abbildung 3-7).

Ergebnisse

Bidirektionale Substratpassage durch konstriktionserweiterte FNT-Varianten bei pH 6,8

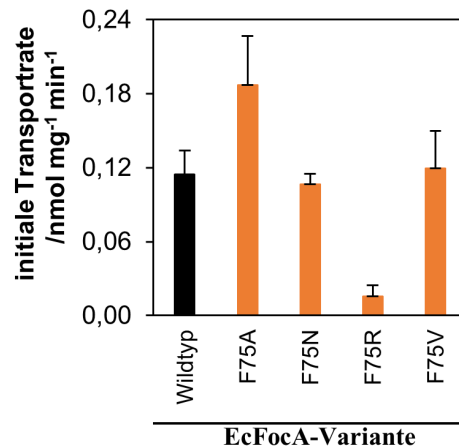


Abbildung 3-7: Initiale Transportraten von EcFocA-Wildtyp (schwarz) und Varianten mit Modulation am F75 (orange) bei pH 6,8. Fehler stellen S.E.M. dar, für F75R S.D., N = 1-3.

Die größte Porenerweiterung an Position 75 durch Substitution mit einem Alanin führte zum größten Anstieg der initialen Transportrate, wobei der Effekt bei der Valin-Variante schwächer war und die Asparagin-Variante mit dem kleinsten Effekt der Porenerweiterung eine wildtypähnliche Rate aufwies. Die Polarität der eingeführten Aminosäure schien keinen Effekt auf die Substratpassage zu haben. Das Einbringen des positiven Arginin-Restes hingegen verlangsamte den Transport deutlich. Dem gegenüber steht die F202A-Variante, die ebenfalls nur eine Mutation an der exoplasmatische Konstriktion aufwies, aber keine Substratpassage zeigte.

Doppel-Alanin, -Valin und -Leucin-Varianten der exoplasmatischen Konstriktion zeigten ein im Vergleich zum EcFocA-Wildtyp deutlich vermindertes maximales Aufnahmevermögen (um 0,01 nmol mg⁻¹) und reduzierte initiale Transportraten (um 0,02 nmol mg⁻¹ min⁻¹, Abbildung 3-8). Die F75A/F202A-Variante zeigte hierbei die höchste Aufnahmekapazität. Das Signal-Rausch-Verhältnis war für alle drei dieser nur schwach leitende EcFocA-Varianten bei Aufnahme von Formiat nicht optimal. So sind die drei Varianten unter Berücksichtigung der Fehler wohl alle ca. gleich gehindert in ihrem Aufnahmeverhalten und eine exakte Differenzierung zwischen den Varianten war mit dem durchgeführten Assay nicht möglich. Deshalb wurde lediglich die Doppel-Alanin Mutante im weiteren Verlauf näher untersucht.

Ergebnisse

Bidirektionale Substratpassage durch konstriktionserweiterte FNT-Varianten bei pH 6,8

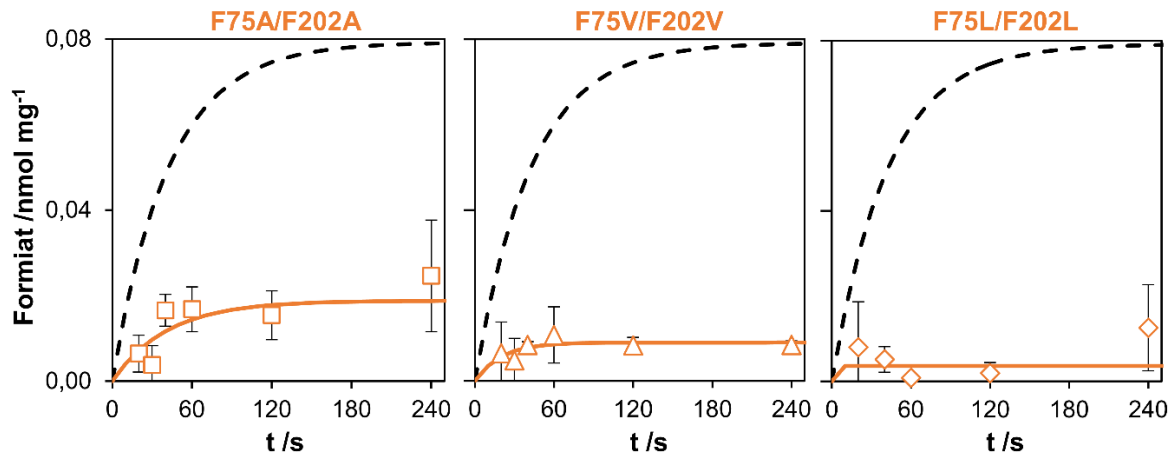


Abbildung 3-8: Zeitabhängige Formiat-Aufnahme bei pH 6,8 durch EcFocA-Varianten mit doppelter Mutation der exoplasmatischen Konstriktion: Alanin (links, Quadrate, $N \geq 3$), Valin (Mitte, Dreiecke, $N = 2$) und Leucin (rechts, Rauten, $N = 2$). Der Kurvenverlauf des Wildtyps ist schwarz-gestrichelt eingezeichnet. Das Hintergrundsignal wurde abgezogen, Fehler stellen S.E.M. dar.

Da die einfach mutierte F75N-Variante, die dem EhFNT nachempfunden war, eine wildtypähnliche Aufnahmekurve zeigte, wurde auch eine Doppelmutante des EcFocA generiert, bei der die zweite konstriktionsbildende Aminosäure dem EhFNT nachempfunden war. Diese F75N/A212G-Variante zeigte jedoch, analog den drei bereits beschriebenen Doppelmutanten, nur eine sehr geringe Passage von Formiat und stark verminderte initiale Transportraten im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3-9).

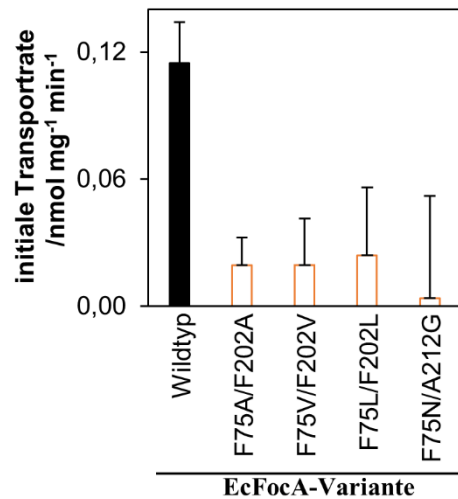


Abbildung 3-9: Initiale Transportraten von EcFocA-Wildtyp (schwarz) und -Varianten mit doppelter Modulation der exoplasmatischen Konstriktion (orange, geöffnet) bei pH 6,8. $N = 2-3$, Fehler stellen S.E.M. dar.

3.1.2 Erweiterung der zytoplasmatischen Konstriktion

Der Einfluss der zytoplasmatischen Konstriktion des EcFocA auf die initialen Transportraten und Aufnahmekapazitäten in die Hefe wurde ebenfalls durch einfache oder doppelte Mutation an den voluminösesten konstriktionsbildenden Aminosäuren (L79, L89) näher untersucht. Das Einbringen nur eines Alanin-Restes an Position 89 führte bei pH 6,8 zu einer verminderten initialen Transportrate von Formiat über das modulierte FNT in die Hefe von $(0,0071 \pm 0,007) \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, erreichte jedoch nach 4 min ca. den selben Wert wie der EcFocA-Wildtyp von $(0,074 \pm 0,008) \text{ nmol mg}^{-1}$ (Abbildung 3-10). Das Einbringen eines weiteren Alaninrestes an Position 79 führte zu erheblich gehinderten Formiatpassage über das modulierte FNT. Die Aufnahmekapazität unterschied sich nicht mehr vom Hintergrundsignal (Abbildung 3-10). Im Vergleich zur Erweiterung der exoplasmatischen Konstriktion war der Effekt auf die Substratpassage in Importrichtung bei einfacher Mutation der zytoplasmatischen Konstriktion demnach stärker ausgeprägt.

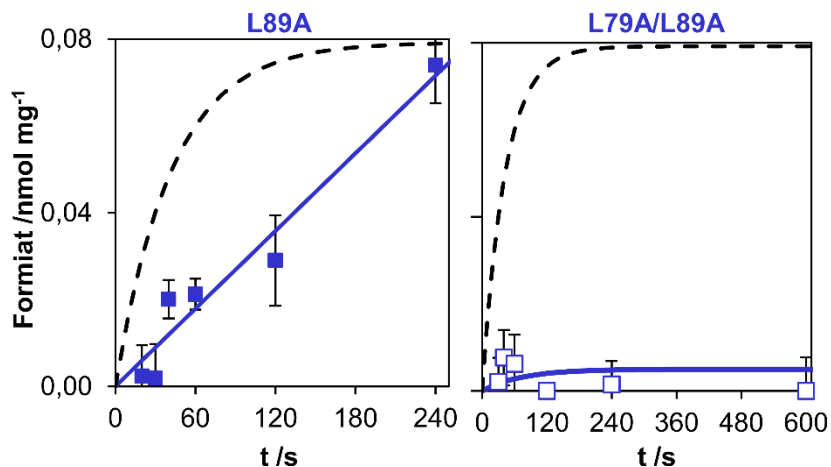


Abbildung 3-10: Zeitabhängige Formiat-Aufnahme bei pH 6,8 durch EcFocA-Varianten mit Mutation der zytoplasmatischen Konstriktion: L89A (links, geschlossen) und (rechts, offen). Der Kurvenverlauf des Wildtyps ist schwarz-gestrichelt eingezeichnet. Das Hintergrundsignal wurde abgezogen. N = 3, Fehler stellen S.E.M. dar.

3.1.3 Zusammenspiel beider Konstriktionen

Alle Hefen, die EcFocA-Kreuz-Mutanten exprimierten (Abbildung 3-1), zeigten bei pH 6,8 keinen Unterschied in der Substrataufnahme zum Hintergrund (Abbildung 3-11). Hiervon wurden drei verschiedene Varianten untersucht, die alle keine Passage von Formiat ermöglichten.

Ergebnisse

Bidirektionale Substratpassage durch konstriktionserweiterte FNT-Varianten bei pH 6,8

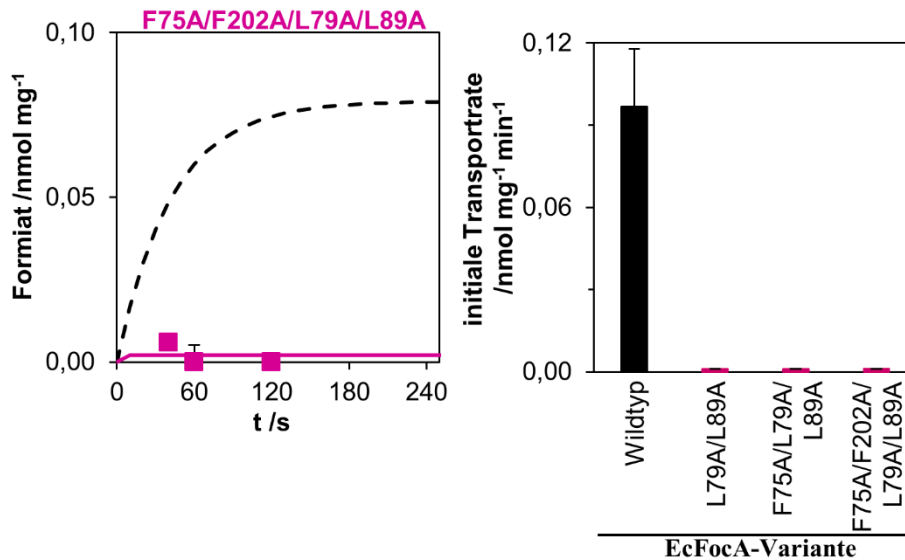


Abbildung 3-11: Zeitabhängige Formiat-Aufnahme bei pH 6,8 durch EcFocA-F75A/F202A/L79A/L89A (links, pink), der Kurvenverlauf des Wildtyps ist schwarzgestrichelt eingezeichnet. Rechts: initiale Transportraten bei pH 6,8 von den F75/L79A-, F75/L79A/L89A- und F75A/F202A/L79A/L89A-Varianten. Das Hintergrundsignal wurde abgezogen. N = 2-3, Fehler stellen S.E.M. dar.

3.1.4 Direktionalität der Substratpassage: Influx vs. Efflux

Um die bidirektionale Funktionalität der FNT nach Eröffnung der Konstriktionen ebenfalls zu prüfen, wurden funktionsfähige Mutanten des EcFocA auch auf den Substratausstrom durch Hefemembranen hin untersucht. Damit sollte auch geprüft werden, ob der Effekt der Konstriktionserweiterung abhängig von der Richtung der Substratpassage ist, um Widersprüche diesbezüglich in der Literatur zu untersuchen (1.2.2.3). Hiermit konnte zudem überprüft werden, ob die Neutralisierung der Säure nach Eröffnung der Konstriktionen weiterhin durch das Protein erleichtert wird, oder ob das geladene Anion nun als Substrat dient: Kann ein Protein die Neutralisation nicht begünstigen, ist das Substrat durch das Prinzip der Ionenfalle in den Hefen nach Aufnahme gefangen, da das Anion der dissoziierten Säure dann im gepufferten Zytosol verbleibt. Echte bidirektionale Transporter oder Kanäle, die das Proton auf das Säureanion übertragen, können auch aus dem neutral gepufferten Zytosol die protonierte Säure entlang des Konzentrationsgefälles transportieren (Geistlinger *et al.*, 2022).

So wurde der Formiat-Efflux aus Hefezellen, die EcFocA-Varianten exprimierten, gemessen (2.14.1, Abbildung 3-3). Hierfür wurden zunächst je eine Kontrolle vermessen, um die beschriebenen Effekte zu beobachten: Das humane Aquaporin 9 (hAQP9) als klassischer Kanal der Milchsäure leitet und der humane Monocarboxylattransporter 1 (hMCT1), welcher Proton und L-Laktat transportiert,

Ergebnisse

Bidirektionale Substratpassage durch konstriktionserweiterte FNT-Varianten bei pH 6,8

und somit keine bereits neutrale Milchsäure für die Substratpassage benötigt. Hierbei wurde für das hMCT1 ein beschränkter Abfall des Signals, und damit der zu erwartende Efflux des L-Laktates aus den Zellen, beobachtet (Abbildung 3-12). Für das hAQP9 hingegen wurde ein stetiges Signal, dass den Verbleib des Substrates in den Zellen anzeigte, beobachtet. Der leichte Anstieg der Kurve war Messungenauigkeiten zuzuordnen. Keinesfalls jedoch wurde ein Ausstrom aus den Zellen beobachtet, und somit das Prinzip der Ionenfalle deutlich.

Hefen, die EcFocA exprimierten, zeigten einen Ausstrom von Formiat. Für dieses Experiment wurde Formiat verwendet, da das EcFocA kein L-Laktat leiten kann (Wiechert *et al.*, 2017). Der Ausstrom ging deutlich schneller vonstatten, als jener von L-Laktat über das hMCT1.

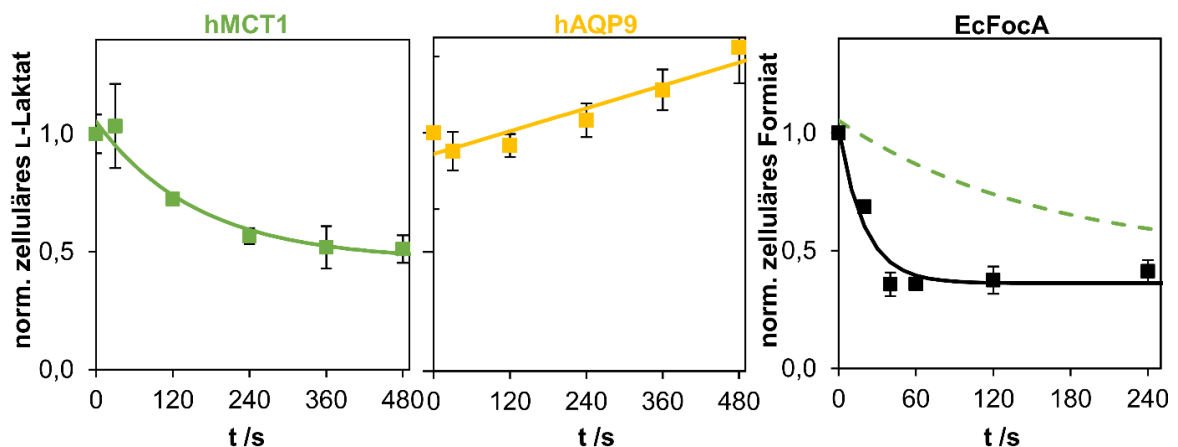


Abbildung 3-12: Zeitabhängiger L-Laktat-Efflux bei pH 6,8 durch hMCT1 (grün, links), hAQP9 (gelb, Mitte) und Formiat-Efflux durch EcFocA (rechts, schwarz), MCT1 Kurvenverlauf grün-gestrichelt eingezeichnet. Das Hintergrundsignal wurde abgezogen. N = 2, Fehler stellen S.E.M. dar.

Es wurde dann überprüft, ob für die einfach mutierten EcFocA-Varianten F75A und L89A ebenfalls ein Ausstrom zu beobachten ist. Varianten mit mehrfacher Mutation konnten nicht getestet werden, da die Aufnahmekapazität zu gering war, um sie für Efflux-Experimente ausreichend zu beladen (Abbildung 3-3). Für beide getesteten Varianten wurde ein schneller Ausstrom beobachtet (Abbildung 3-13). Die Ratenkonstante aus dem Kurvenfit für beide Varianten war im Vergleich zum Wildtyp mit $(0,050 \pm 0,02) \text{ s}^{-1}$ leicht vermindert (F75A: $(0,037 \pm 0,01) \text{ s}^{-1}$ und L89A: $(0,028 \pm 0,01) \text{ s}^{-1}$).

So zeigte die L89A-Variante mit Erweiterung der zytosolischen Konstriktion sowohl für Influx- als auch Efflux-Experimente eine leicht geringere Transportrate und ähnliche Aufnahmekapazitäten (3.1.2). Die F75A-Variante war hingegen bei

Ergebnisse

Bidirektionale Substratpassage durch konstriktionserweiterte FNT-Varianten bei pH 6,8

Influx-Experimenten schneller als der Wildtyp und zeigt für diese Efflux-Experimente ein wildtypähnliches Verhalten.

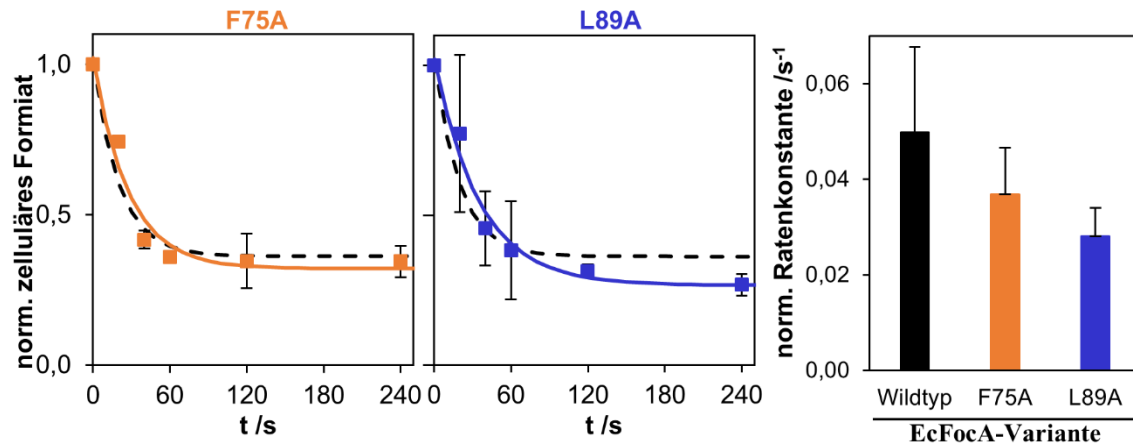


Abbildung 3-13: Zeitabhängiger Formiat-Efflux bei pH 6,8 durch die EcFocA-Varianten F75A (orange, links) und L89A (blau, Mitte). Der Wildtyp-Kurvenverlauf ist gestrichelt eingezeichnet. Rechts: Die abgeleiteten, normierten Ratenkonstanten. N = 2, Fehler stellen S.E.M. dar. Das Hintergrundsignal wurde abgezogen.

3.1.5 Effekt der Porenerweiterung auf das eukaryotische PfFNT

Um die Rolle der Konstriktionen universell zu prüfen, wurde auch ein eukaryotischer Vertreter, das PfFNT, in den konstriktionbildenden Aminosäuren moduliert und auf Änderung in des Transportverhaltens untersucht. Zwei Alanin-Mutanten der exoplasmatischen Konstriktion, PfFNT-F90A und -F223A, entsprechend dem EcFocA-F75A und -F202A (Abbildung 3-5), zeigten eine verminderte initiale Transportrate gegenüber dem Wildtyp-PfFNT (Abbildung 3-14). Die Aufnahmekapazität für L-Laktat für die F223A-Variante war dabei nicht vom Hintergrundsignal zu unterscheiden. Dieses Verhalten entspricht dem der F202A-Variante des EcFocA, welche keine Passage von Formiat ermöglichte (3.1.1, Abbildung 3-5). Die PfFNT-F90A-Variante leitete initial nur mit etwa halber Geschwindigkeit des Wildtyps und entsprach so nicht der F75A-Variante des EcFocA, welche schneller als das Wildtyp-EcFocA leitet (Abbildung 3-5).

Forschungsergebnisse aus Inhibitorstudien in Zusammenarbeit mit Dr. Philipp Walloch und Dr. Tobias Spielmann ergaben, dass eine Mutation der zytoplasmatisch-konstriktionbildenden Aminosäure V196 zum Leucin eine Resistenz gegenüber dem PfFNT-Inhibitor BH267.meta zeigte (Walloch, 2021). Gleiches stellte sich für eine am N-Terminus gelegene G21E-Mutation heraus. Deshalb wurden diese Varianten ebenfalls generiert und auf veränderte Substratpassage hin untersucht. Beide zeigten vom Wildtyp abweichende, niedrigere initiale Transportraten von $(0,11 \pm 0,02) \text{ mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (V196L) und

Ergebnisse

pH-abhängige Substratpassage durch FNT mit erweiterten Konstriktionen

($0,060 \pm 0,02$) $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ (G21E). Dies entspricht für die V196L-Variante den Ergebnissen der Experimente mit der EcFocA-L89A-Variante: Bereits die einfache Mutation der zytoplasmatischen Konstriktion verringert die Substratpassage.

Das PfFNT-G21E zeigte eine erhöhte Aufnahmekapazität. Es wurde sich jedoch im weiteren Verlauf auf die Charakterisierung der Konstriktionen beschränkt, so dass dieses Verhalten nicht näher untersucht wurde.

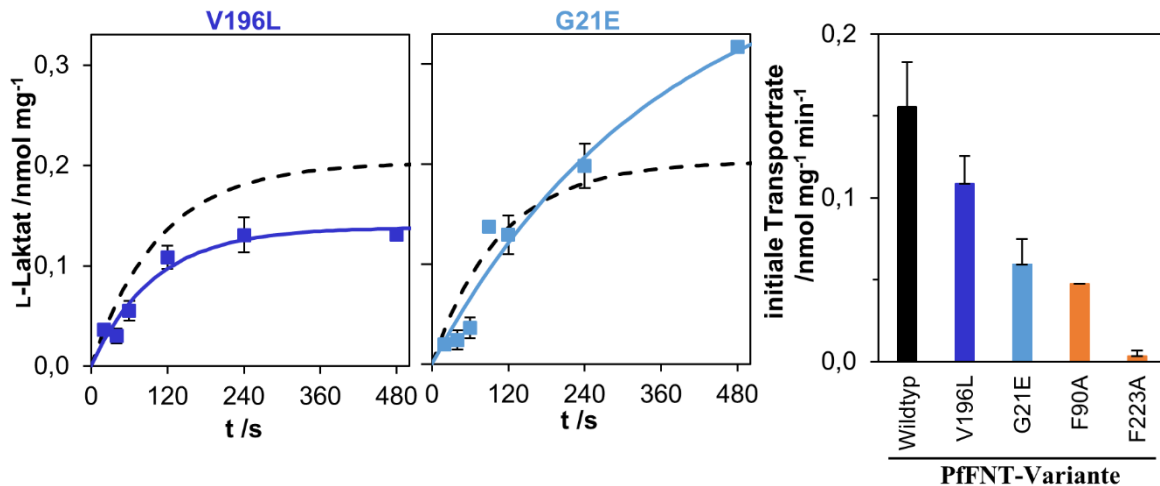


Abbildung 3-14: Zeitabhängige L-Laktat-Aufnahme bei pH 6,8 durch die PfFNT-Varianten V196L (links, dunkelblau) und G21E (Mitte, hellblau). Der Kurvenverlauf des PfFNT-Wildtyps ist schwarz-gestrichelt eingezeichnet, N = 3. Rechts: Initiale Transportraten aller generierten und in W3031A Δ jcn1 Δ ady2 Hefen exprimierten PfFNT-Varianten bei pH 6,8. N = 2-3. Das Hintergrundsignal wurde abgezogen, Fehler stellen S.E.M. dar.

3.2 pH-abhängige Substratpassage durch FNT mit erweiterten Konstriktionen

Der Transport durch FNT ist protonengekoppelt. Darum steigt für FNT im Säuren bei erhöhter Protonen- und damit Co-Substrat-Konzentration, die initiale Transportrate (Wiechert und Beitz, 2017b). Hierbei wird nicht das Proton und die anionische Säure separat, sondern die neutralisierte Säure durch den FNT-Transportpfad geleitet (Lü *et al.*, 2013; Wiechert und Beitz, 2017b). Um den Einfluss der Konstriktionen auf die Substratprotonierung näher zu untersuchen, wurden deshalb die initialen Transportraten mehrerer FNT-Varianten mit sinkendem pH verfolgt.

Es zeigte sich für die Wildtyp-FNT der erwartete glockenförmige Kurvenverlauf (Wiechert und Beitz, 2017b). In der pH-Spanne von 4,8-7,8 zeigte der EcFocA-Wildtyp, einen exponentiellen Anstieg der initialen Transportrate zum Säuren hin (Abbildung 3-15). Sie stieg über das 30-fache im Vergleich zu pH 6,8 an (3.1). Für pH-Werte unter 4,8 sank die initiale Transportrate wieder. Auch für das PfFNT stieg

Ergebnisse

pH-abhängige Substratpassage durch FNT mit erweiterten Konstriktionen

die initiale Transportrate im Sauren, erreicht bei ca. pH 4,8 ihr Maximum und sank danach wieder ab (Abbildung 3-15). Es ist zu bemerken, dass für das PfFNT die initialen Transportraten für Formiat nicht so sehr erhöht wurden wie im EcFocA. Mit diesen Kurven wurden die pH-abhängigen initialen Transportraten der Varianten mit eröffneten Konstriktionen verglichen.

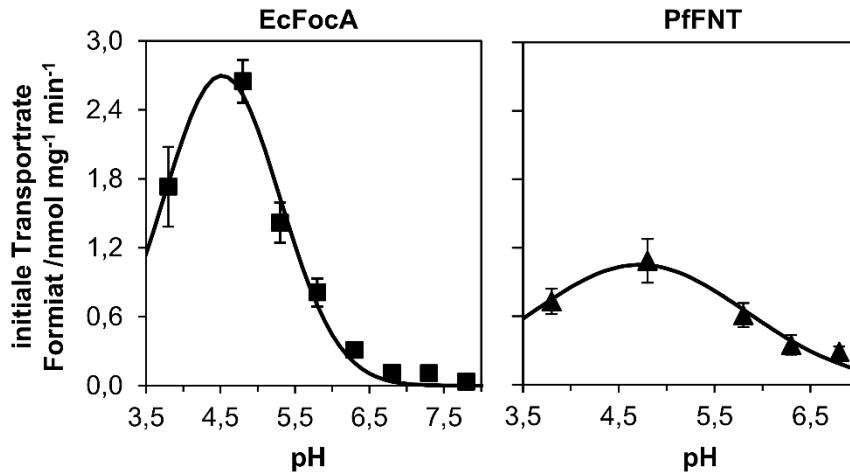


Abbildung 3-15: Initiale Transportraten für Wildtyp-EcFocA (links, Quadrate) und -PfFNT (rechts, Dreiecke) mit steigendem pH. N = 3, Fehler stellen S.E.M dar. Das Hintergrundsignal wurde abgezogen.

Zunächst wurden die im Neutralen leitfähigen, einfach modulierten Alanin-Mutanten auf die Substratpassage im Sauren untersucht. Es galt zu prüfen, ob mit erhöhter Co-Substratkonzentration die Leitfähigkeit analog zunimmt und so ggf. dem Wildtyp ähnliche initiale Raten wiederhergestellt werden oder ob das Verhalten durchgängig unterschiedlich zum Wildtyp bleibt.

Die initialen Transportraten von EcFocA-F75A und der analogen PfFNT-F90A-Variante blieben über die gesamte untersuchte pH-Spanne nahezu konstant, und unterschieden sich somit stets vom jeweiligen Wildtyp. Dieser Unterschied wurde demnach mit sinkendem pH größer. Es war besonders auffällig, dass die EcFocA-F75A-Variante, die bei pH 6,8 noch schnellere initiale Transportraten als der Wildtyp aufwies (3.1.1), bei niedrigeren pH-Werten deutlich langsamer als dieser war (Abbildung 3-16). Auch die analoge Variante der zytoplasmatischen Konstriktion, EcFocA-L89A, wies dieses Verhalten auf: Mit steigender Protonenkonzentration erhöhte sich der Unterschied der initialen Transportrate zum Wildtyp, da die initiale Transportrate nahezu konstant blieb (Abbildung 3-16). Auch die analoge PfFNT-F90A-Variante zeigte eine nahezu konstante initiale Transportrate über die gesamte gemessene pH-Spanne (Abbildung 3-16).

Ergebnisse

pH-abhängige Substratpassage durch FNT mit erweiterten Konstriktionen

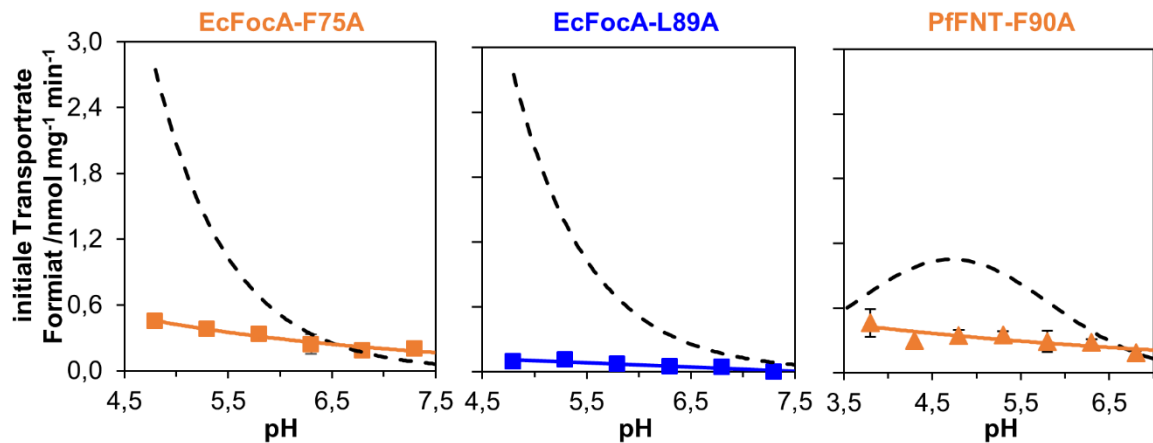


Abbildung 3-16: pH-abhängige initiale Transportraten für einfach in der Konstriktion zum Alanin mutierte FNT: EcFocA-F75A (links, orangene Quadrate), EcFocA-L89A (Mitte, blaue Quadrate) und PfFNT-F90A (rechts, orangene Dreiecke). Der Kurvenverlauf des jeweiligen Wildtyps ist schwarz-gestrichelt eingezeichnet, das Hintergrundsignal wurde abgezogen. N = 3, Fehler stellen S.E.M dar.

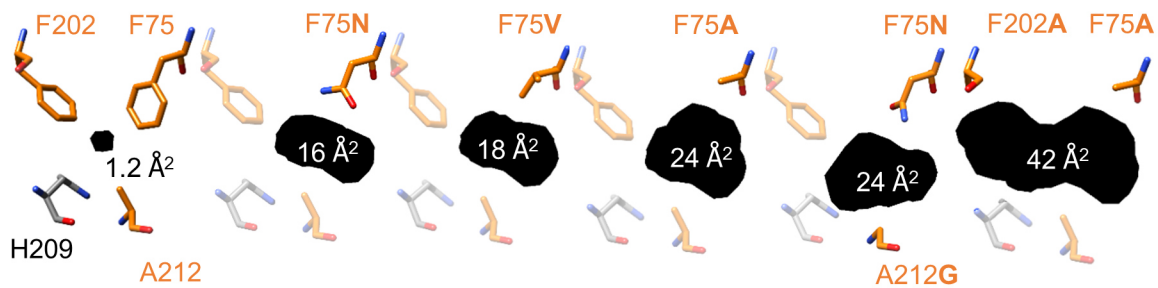
Die EcFocA-F75A-Variante zeigt im Vergleich zum Wildtyp bereits eine 24-fache Erweiterung des Porendurchmessers, die F90A-Variante des PfFNT eine dreifache (2.18). Auf zytoplasmatischer Seite wurde mit einfacher Mutation zum Alanin eine sechsfache Vergrößerung des Porendurchmessers erzielt. Dies zeigt zum einen den Unterschied zwischen eu- und prokaryotischen FNT sowie den Unterschied zwischen exo- und zytoplasmatischer Konstriktion (Abbildung 3-17). Es war bekannt, dass das prokaryotische EcFocA einen engeren Transportpfad als das PfFNT hat, und dass die zytoplasmatische Konstriktion enger als die exoplasmatische ist (Wang *et al.*, 2009, Lyu *et al.*, 2021). Trotzdem schien eine jeweilige Erweiterung stets denselben Effekt auf die Substratpassage zu bewirken.

Weitere Varianten mit im neutralen pH veränderten Aufnahmeverhalten in die Hefe (3.1) zeigten eine, der Substitution entsprechende, kleinere oder größere Erweiterung der Konstriktionen (Abbildung 3-17). Mit diesen Varianten konnte untersucht werden, ab welchem Porendurchmesser die pH-Abhängigkeit der initialen Transportrate verloren geht. Hierfür wurden die F75N- und F75V-Varianten des EcFocA mit kleinerem Porendurchmesser als die F75A-Variante sowie die Doppelmutanten F75A/F202A und F75N/A212G als auch die Quadrupelmutante F75A/F202A/L79A/L89A mit größerem Porendurchmesser als F75A auf pH-abhängige Substratpassage untersucht.

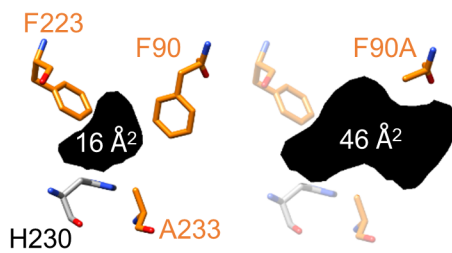
Ergebnisse

pH-abhängige Substratpassage durch FNT mit erweiterten Konstriktionen

exoplasmatische EcFocA-Konstriktion, exoplasmatische Aufsicht



exoplasmatische PfFNT-Konstriktion, exoplasmatische Aufsicht



cytoplasmatische EcFocA-Konstriktion, zyttoplasmatische Aufsicht

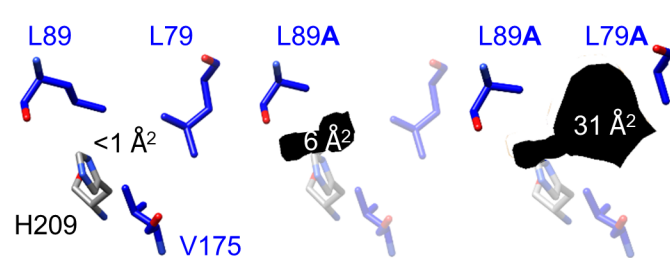


Abbildung 3-17: Effekt der Porenerweiterung auf die Querschnittsfläche der Konstriktion (schwarz) im FNT-Transportpfad.

Von allen untersuchten EcFocA-Varianten (Abbildung 3-18) zeigte nur die F75N-Variante einen wildtypähnlichen Kurvenverlauf mit exponentiellem Anstieg hin zum Säuren (Abbildung 3-18). Diese Variante stellt auch die kleinste Porenerweiterung dar. Die weiteren Einzelmutanten zeigten einen analogen Verlauf zur F75A-Variante. Die Doppelmutanten unterschieden sich ab einem pH-Wert von 6,3 nicht mehr vom Hintergrund. Die getestete Quadrupel-Mutante zeigte auch bei pH 3,8 keine Passage von Formiat. Diese pH-abhängigen Daten zeigen, dass die Enge der FNT-Konstriktionen für den funktionsfähigen pH-gekoppelten FNT-Transportmechanismus mitverantwortlich ist.

Ergebnisse

pH-abhängige Substratpassage durch FNT mit erweiterten Konstruktionen

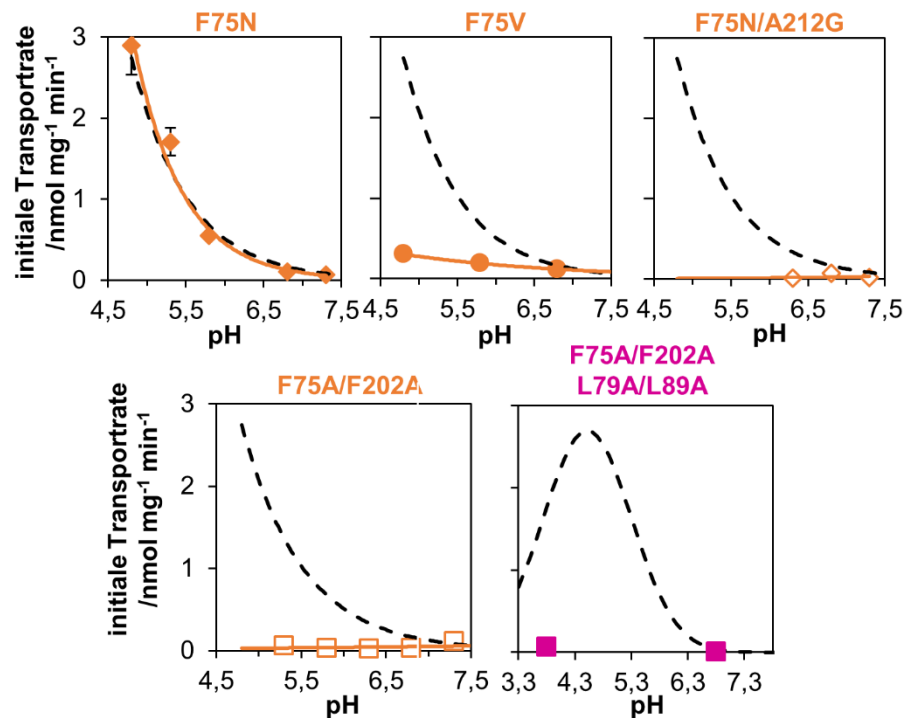


Abbildung 3-18: pH-abhängige initiale Transportraten für in der exoplasmatischen Konstriktion mutierte EcFocA-Varianten: F75N (Rauten, N = 3), F75V (Kreise, N = 3), F75N/A212G (geöffnete Rauten, N = 2) und F75A/F202A (geöffnete Quadrate, N = 3) sowie die Kreuz-Mutante F75A/F202A/L79A/L89A (pink, N = 2) bei 1 mM Formiat-Gradienten. Der Wildtypkurvenverlauf ist schwarz-gestrichelt eingezeichnet, Fehler stellen S.E.M dar. Das Hintergrundsignal wurde abgezogen.

In der Literatur ist unter anderem postuliert, dass das zentrale Histidin für die pH-gekoppelten Transportraten verantwortlich ist (1.2.2.1). Es sind zur Mutation des zentralen Histidins und anschließender Untersuchung der Funktionalität des FNTs diverse Experimente beschrieben. Die meisten Mutationen (zu Asparagin, Phenylalanin, Alanin, Glutamin und Asparaginsäure; Wiechert, 2017) führten zum Erliegen der Funktionsfähigkeit. Eine Tyrosin-Mutante des EcFocA ist hingegen als funktionell beschrieben (Hunger *et al.*, 2014). So wurde eine EcFocA-H209Y-Mutante auf Formiatpassage im Neutralen und pH-abhängig untersucht. In der dbFNT (Mukherjee *et al.*, 2017, abgerufen von Prof. Dr. E. Beitz 2017) findet sich auch ein potenzielles FNT aus *Lactobacillus helveticus* (LhFNT), welches ein Prolin an der analogen Position trägt. Eine EcFocA-H209P-Variante wurde in Anlehnung daran generiert und untersucht. Beide EcFocA-Varianten ermöglichten jedoch die Aufnahme von Formiat in die Hefe nicht (Abbildung 3-19).

Ergebnisse

Michaelis-Menten-Kinetik nach Konstriktionserweiterung

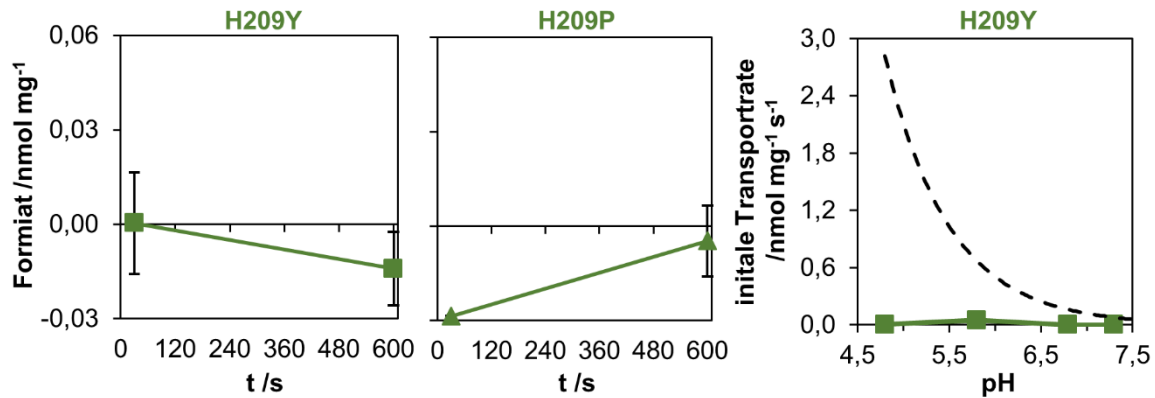


Abbildung 3-19: Zeitabhängige Formiat-Aufnahme bei pH 6,8 durch EcFocA-Varianten mit Mutation des zentralen Histidins: H209Y (Quadrate), und H209P (Dreiecke). Rechts: pH-abhängige initiale Transportraten der H209Y-Variante, der Kurvenverlauf des Wildtyps ist schwarz-gestrichelt eingezeichnet. Das Hintergrundsignal wurde abgezogen. N = 1, Fehler stellen S.D. dar.

Aus allen pH-abhängigen Messungen ließ sich eine erste Hypothese aufstellen: Der Unterscheid zwischen den initialen Transportraten vom Konstrukt zum jeweiligen Wildtyp nimmt mit steigender Protonenkonzentration zu. So wird voraussichtlich ein Proton an der beobachteten Abweichung vom wildtypähnlichen Verhalten beteiligt. Durch die Erweiterung der Pore wird demnach eine Protonierungsstelle im Protein freigelegt, die dem externen Puffer bisher nicht zugänglich war. Als einzige protonierbare Aminosäure wird das zentrale Histidin durch die erläuterten Punktmutationen lösungsmittelzugänglich (Abbildung 3-17), alle anderen freigelegten Aminosäuren sind nicht protonierbar (siehe 4.5).

Es kann zudem eine zweite Hypothese aus der Literatur aufgegriffen werden: Durch die Erweiterung einer Konstriktion dringt Wasser tiefer als beim Wildtyp in die Pore hinein, da nun genug Raum dafür ist (Abbildung 1-13, Abbildung 3-17).

Diese beiden Hypothesen, dass durch Erweiterung der Pore Wasser mit in den FNT-Transportpfad eindringt und dadurch das zentrale Histidin protoniert werden kann, sollten im weiteren Verlauf geprüft werden.

3.3 Michaelis-Menten-Kinetik nach Konstriktionserweiterung

Um die Hypothese der Protonierung des Histidins nach Konstriktionserweiterung zu prüfen, wurden von EcFocA-F75A Michaelis-Menten-Kinetiken aufgenommen. Diese Variante wurde gewählt, da sie die größte Porenerweiterung der im Neutralen leitfähigen Mutanten aufwies. Mit einer Michaelis-Menten-Kinetik kann die Substrataffinität zum Protein berechnet sowie

Ergebnisse

Michaelis-Menten-Kinetik nach Konstriktionserweiterung

die maximale Transportgeschwindigkeit des Proteins extrapoliert werden (Nelson und Cox, 2013). Die Substrataffinität wäre für die F75A-Variante bei protoniertem, geladenem Histidin zum anionischen Substrat ggf. erhöht und abzuleitende maximale Geschwindigkeiten (v_{\max}) des Proteins können sich ebenfalls bei Inhibition der Substratpassage ändern. Zum Abbilden der Michaelis-Menten-Kinetik des EcFocA-Wildtyps und der F75A-Variante wurden zunächst initiale Transportraten mit steigender Substratkonzentration bei pH 6,8 gemessen.

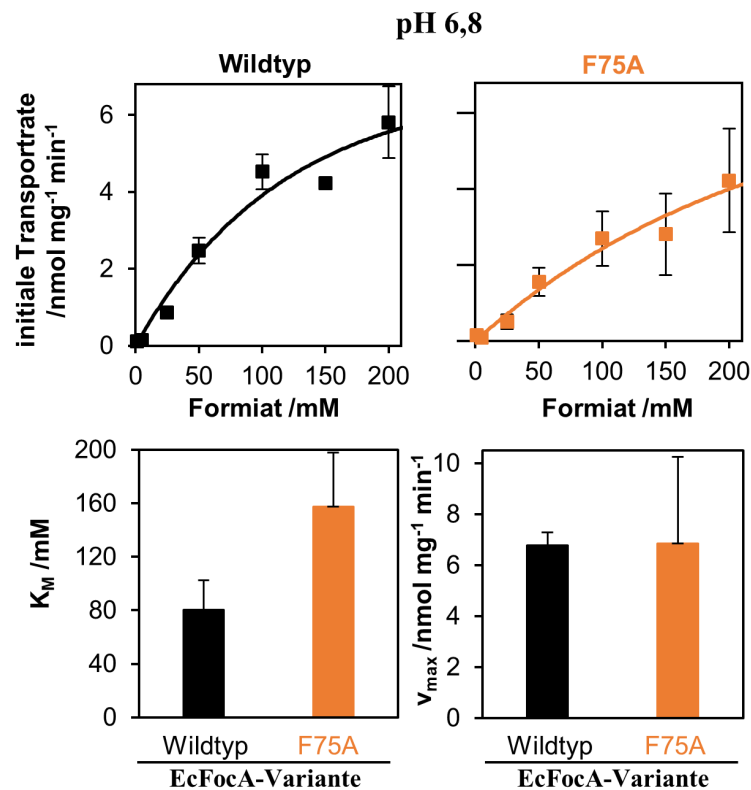


Abbildung 3-20: Oben: Michaelis-Menten-Kinetik für EcFocA-Wildtyp (schwarz) und die F75A-Variante (orange) bei pH 6,8. $N \geq 3$, Fehler stellen S.E.M. dar, Der Hintergrund wurde abgezogen. Unten: Aus dem Kurvenfit leiten sich K_M -Werte und maximale Geschwindigkeiten (v_{\max}) ab, Fehler stellen den Standardfehler dar.

Diese Messung lieferte für den Wildtyp und die F75A-Variante jedoch keine unterschiedlichen Werte (Abbildung 3-20). Beide Kurven stiegen nur langsam an, und erreichten bis zur maximal gemessenen Substratkonzentration von 200 mM Formiat kein Plateau. Die initialen Transportraten unterscheiden sich auf einem Signifikanzniveau von 95 % zu keiner gemessenen Konzentration (t-Test, 2.20). Aus dem Kurvenfit abgeleitete K_M -Werte lagen wie für EcFocA und Kanalproteine bekannt im hohen Bereich (Wiechert und Beitz, 2017b) (Wildtyp: (81 ± 22) mM; F75A: (158 ± 40) mM). Die maximalen Geschwindigkeiten ließen ebenfalls bei neutralem pH keinen Unterschied zwischen Wildtyp und F75A-Mutante feststellen (Wildtyp: $(6,7 \pm 0,5)$ nmol mg⁻¹ min⁻¹; F75A: $(6,8 \pm 3,4)$ nmol mg⁻¹ min⁻¹).

Ergebnisse

Michaelis-Menten-Kinetik nach Konstriktionserweiterung

Die Michaelis-Menten-Kinetiken wurden dann bei zehnfach erhöhter Protonenkonzentration aufgenommen, da bereits beobachtet wurde, dass sich der Unterschied der initialen Transportrate zwischen der Mutante und dem Wildtyp im Sauren vergrößert (3.2). Tatsächlich unterschieden sich die initialen Transportraten der Variante und des Wildtyps in dieser Messung zu jeder Konzentration auf einem Signifikanzniveau von 95 % trotz erhöhter Schwankungen der Messwerte signifikant (t-Test, 2.20, Abbildung 3-21).

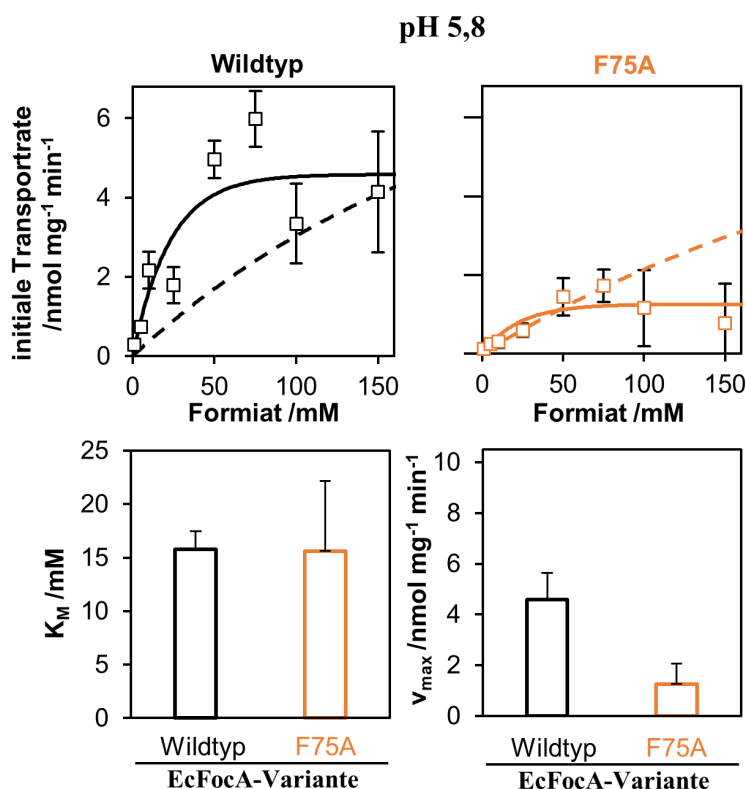


Abbildung 3-21: Oben: Michaelis-Menten Kinetik für EcFocA Wildtyp (schwarz) und F75A-Variante (orange) bei saurem pH von 5,8. Das Verhalten bei pH 6,8 ist gestrichelt eingezeichnet. $N \geq 3$, Fehler stellen S.E.M. dar, der Hintergrund wurde abgezogen. Unten: Aus dem Kurvenfit berechnete K_M -Werte und maximale Geschwindigkeiten. Fehler stellen Standardfehler dar.

Zunächst war zu beobachten, dass für den Wildtyp die initiale Rate im Sauren schneller mit Erhöhung der Substratkonzentration anstieg und ein Plateau bei ca. 70 mM Formiat erreichte. Es ließ sich eine deutlich höhere Substrataffinität bei diesem pH-Wert ableiten. Dies traf nicht auf die F75A-Variante zu. Die initiale Rate stieg für sie im Sauren kaum an und erreichte bereits bei ca. 50 mM Formiat ihr Plateau. Daraus ergaben sich für den Wildtyp und die F75A-Variante zwar ähnliche K_M -Werte um 15 mM. Durch den nur schwachen Anstieg der initialen Rate mit erhöhter Substratkonzentration unterscheiden sich jedoch die maximalen initialen Transportraten von Wildtyp und Mutante auf einem Niveau von 95 % signifikant: Die maximale Geschwindigkeit der Mutante ist fünfmal langsamer als die des

Ergebnisse

Arrhenius-Aktivierungsenergie nach Konstriktionserweiterung

Wildtyps (t-Test, Abbildung 3-21). Dies unterstreicht erneut die Hypothese, dass die Protonen den Transport durch das FNT nach Eröffnung der Konstriktionen inhibieren.

Es wurde ebenfalls versucht, für die noch schwach aktive F75A/F202A-Doppelmutante Michaelis-Menten-Kinetiken aufzuzeichnen. Jedoch war hier die Substrataufnahme so gering, dass bei erhöhten Substratkonzentrationen kein Unterscheid zum Hintergrund mehr zu beobachten war und so konnten keine Aussagen getroffen werden (nicht gezeigt).

3.4 Arrhenius-Aktivierungsenergie nach Konstriktionserweiterung

Ein protoniertes Histidin könnte eine Energiebarriere für ein im Bulkwasser anionisches Substratmolekül darstellen. Deshalb wurden die Arrhenius-Aktivierungsenergien für drei EcFocA-Varianten und eine PfFNT-Variante mit Erweiterung in der exoplasmatischen Konstriktion gemessen. Hierfür wurde die Temperaturabhängigkeit der initialen Transportrate beobachtet.

3.4.1 Aktivierungsenergie bei pH 6,8

Bei Messungen der Temperaturabhängigkeit für das Wildtyp-EcFocA bei pH 6,8 konnte eine sehr niedrige Aktivierungsenergie bestätigt werden, die initiale Transportrate blieb über die gesamte Temperaturspanne nahezu konstant ($E_a = (1,9 \pm 1,7) \text{ kcal mol}^{-1}$; Abbildung 3-22). Die Aktivierungsenergie, die für das PfFNT gemessen wurde, war mit $(7,3 \pm 1,6) \text{ kcal mol}^{-1}$ etwas höher und eine leichte Temperaturabhängigkeit zeigte sich (Abbildung 3-22, Abbildung 3-24).

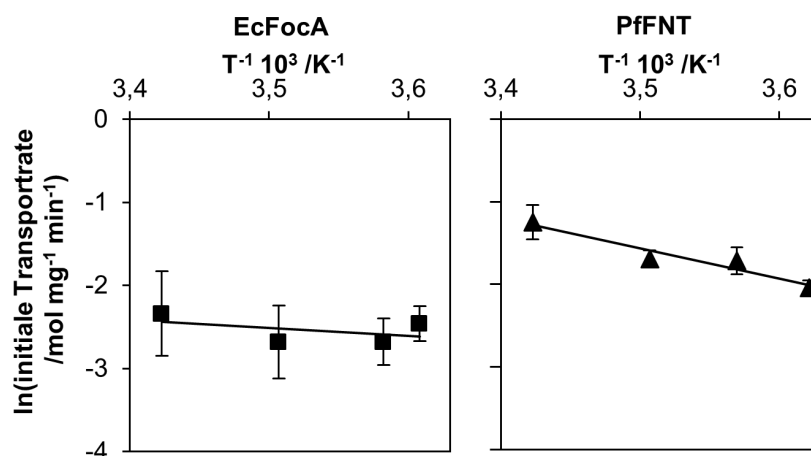


Abbildung 3-22: Temperaturabhängigkeit der initialen Transportraten für Formiat für Wildtyp-EcFocA (links, Quadrate) und -PfFNT (rechts, Dreiecke) bei pH 6. N = 3, Fehler stellen S.E.M. dar, der Hintergrund wurde abgezogen. Aus der Steigung des Fits können Aktivierungsenergien berechnet werden.

Ergebnisse

Arrhenius-Aktivierungsenergie nach Konstriktionserweiterung

Vom EcFocA wurden die F75V- und die F75A-Variante getestet, die sich in der Konstriktions-Querschnittsfläche um ca. 6 \AA^2 unterschieden (Abbildung 3-17) aber beide eine Passage von Formiat im Neutralen ermöglichten. Beide Mutanten zeigten zudem keine Änderung in den initialen Transportraten bei sinkendem pH-Wert (Abbildung 3-16, Abbildung 3-18). Zudem wurde die analoge PfFNT-F90A-Variante getestet.

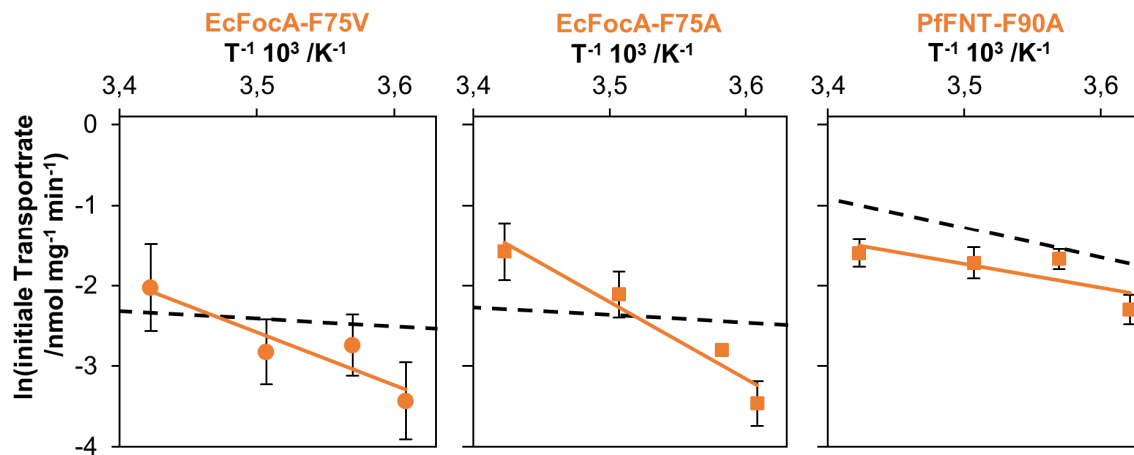


Abbildung 3-23: Temperaturabhängigkeit der initialen Transportraten für FNT-Varianten mit eröffneter exoplasmatischer Konstriktion. EcFocA-F75V (links, Kreise) und -F75A (Mitte, Quadrate) sowie PfFNT-F90A (rechts, Quadrate). Der entsprechende Wildtyp ist gestrichelt eingezeichnet. $N = 3$, Fehler stellen S.E.M. dar, der Hintergrund wurde abgezogen. Aus der Steigung des Fits können Aktivierungsenergien berechnet werden.

Die initialen Transportraten der modulierten EcFocA-Varianten unterschieden sich zu jeder gemessenen Temperatur vom Wildtyp (Abbildung 3-23). Beide Mutanten zeigten eine erhöhte Temperaturabhängigkeit und damit Aktivierungsenergie. Diese Abhängigkeit war für die F75A-Variante mit größerer Konstriktionserweiterung stärker ($E_a = (19,2 \pm 3,9) \text{ kcal mol}^{-1}$) als für die F75V-Variante ($E_a = (13,0 \pm 3,8) \text{ kcal mol}^{-1}$, Abbildung 3-24).

Die F90A-Variante des PfFNT hingegen zeigte keine erhöhte Aktivierungsenergie im Vergleich zum Wildtyp. Analog zum Wildtyp zeigte sie eine leichte Temperaturabhängigkeit ($E_a = (5,8 \pm 1,9) \text{ kcal mol}^{-1}$, Abbildung 3-23, Abbildung 3-24).

Ergebnisse

Arrhenius-Aktivierungsenergie nach Konstriktionserweiterung

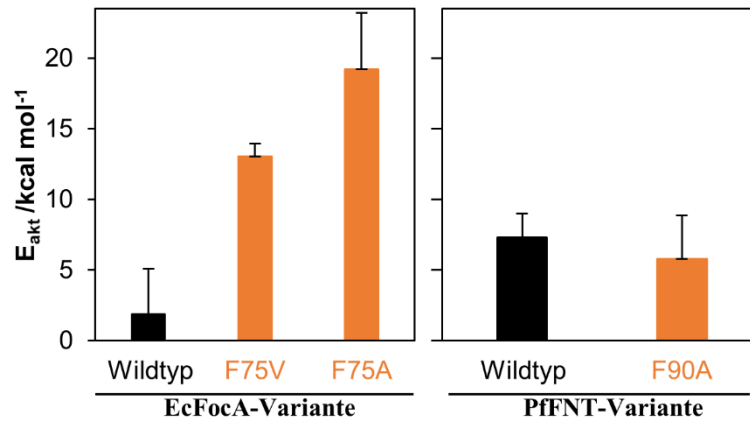


Abbildung 3-24: Arrhenius-Aktivierungsenergien von in der exoplasmatischen Konstriktion einfach mutierten FNT-Varianten. N = 3, Fehler stellen Standardfehler dar.

Die EcFocA-F75A/F202A-Mutante wurde ebenfalls auf die Temperaturabhängigkeit der Substratpassage untersucht. Jedoch war wegen der schwachen Substrataufnahme durch die diese Mutante, die mit kälteren Messtemperaturen noch weiter abnimmt, keine aussagekräftige Messung damit möglich. Die Messungen zeigten große Fehler und nur niedrige Unterschiede zum Hintergrundsignal, und aus dem Kurvenfit wurden keine Daten abgeleitet (Abbildung 3-25).

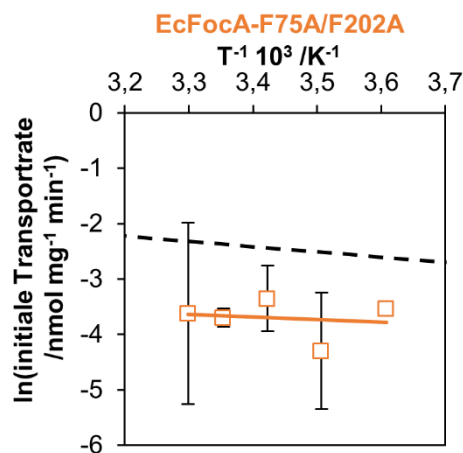


Abbildung 3-25: Temperaturabhängigkeit der initialen Transportraten für die EcFocA-Variante-F75A/F202A. Der entsprechende Wildtyp ist gestrichelt eingezeichnet. N = 2, Fehler stellen S.E.M. dar, der Hintergrund wurde abgezogen.

3.4.2 Aktivierungsenergie bei erhöhter Protonenkonzentration

Schließlich sollte die Hypothese einer Energiebarriere durch ein potenziell protoniertes Histidin, resultierend aus der Porenerweiterung, über die Erhöhung der Protonenkonzentration überprüft werden. Mit Senken des pH-Wertes um eine Einheit steigt die Protonenkonzentration um den Faktor zehn, wodurch auch der Anteil protonierten Histidins steigen sollte und so die Energiebarriere größer wäre.

Ergebnisse

Schwerwassereffekte auf die Substratpassage durch FNT

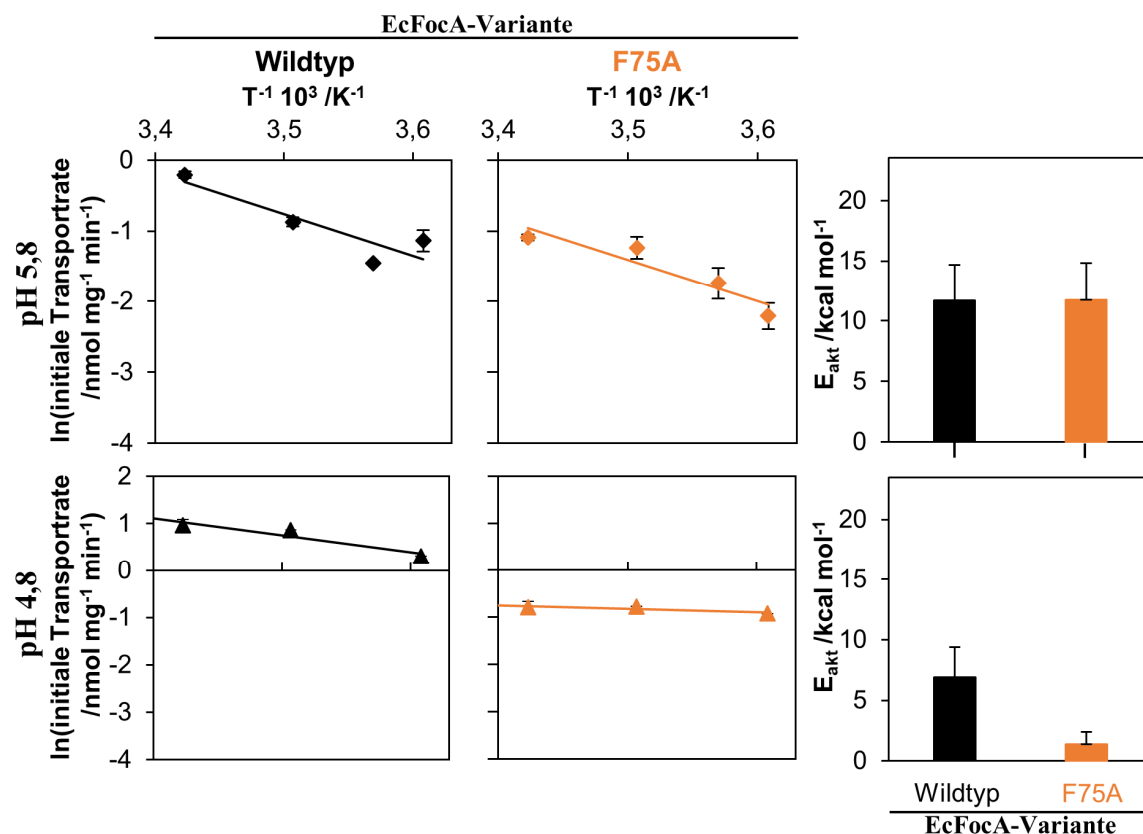


Abbildung 3-26: Temperaturabhängigkeit der initialen Transportraten für den EcFocA-Wildtyp und die F75A-Variante bei pH 5,8 (Rauten, N = 3, Fehler stellen S.E.M. dar) und pH 4,8 (Dreiecke, N = 1, Fehler stellen S.D. dar), der Hintergrund wurde abgezogen. Rechts: Aus dem Kurvenfit abgeleitete Arrhenius-Aktivierungsenergien, Fehler stellen Standardfehler dar.

Für die Messung bei pH 5,8 ergab sich ein Anstieg der Aktivierungsenergie des Wildtyps ($E_a = (9,8 \pm 2,9) \text{ kcal mol}^{-1}$; Abbildung 3-26) im Vergleich zum pH von 6,8 (3.4.1). Die F75A-Mutante verhielt sich erneut nicht wildtypähnlich. Denn im Gegensatz dazu, sank ihre Aktivierungsenergie im Vergleich bei pH 6,8 ($E_a = (11,7 \pm 3,1) \text{ kcal mol}^{-1}$; Abbildung 3-26). So nähern sich die Aktivierungsenergien der beiden Varianten bei pH 5,8 an. Schließlich nahm die Aktivierungsenergie für die F75A-Mutante bei Senken des pH-Wertes um eine weitere Einheit weiter ab ($E_a = 1,4 \pm 1,0 \text{ kcal mol}^{-1}$) wohingegen der Wildtyp nahezu konstant blieb ($E_a = 7,2 \pm 2,5 \text{ kcal mol}^{-1}$; Abbildung 3-26).

3.5 Schwerwassereffekte auf die Substratpassage durch FNT

Eine weitere Methode, um die Beteiligung von Protonen an einer Reaktion zu beobachten und damit die aufgestellten Hypothesen zu prüfen, ist die Verwendung von Deuteriumoxid (schweres Wasser, D₂O). Experimente mit D₂O am EcFocA sind in der Literatur bereits beschrieben, womit u.a. der *dielectric-slide*

Ergebnisse

Schwerwassereffekte auf die Substratpassage durch FNT

Mechanismus abgeleitet werden konnte. Bei einer Reaktion, bei der Bindungsbildungen und -brüche zu einem Wasserstoffion beteiligt sind, bewirkt der sogenannte Schwerwassereffekt veränderte, meist reduzierte, kinetische Parameter, da das Deuterium mit doppelter Masse des Protons deutlich träger ist (Urey *et al.*, 1932). Experimente mit schwerem Wasser liefern jedoch nicht nur Aussagen zur initialen Kinetik der Reaktion, die für FNT bereits untersucht wurde, sondern auch über thermodynamische Effekte, wie die Lage des sich einstellenden Gleichgewichtes und die Raten, mit denen dieses erreicht wird (Fernandez und Murkin, 2020).

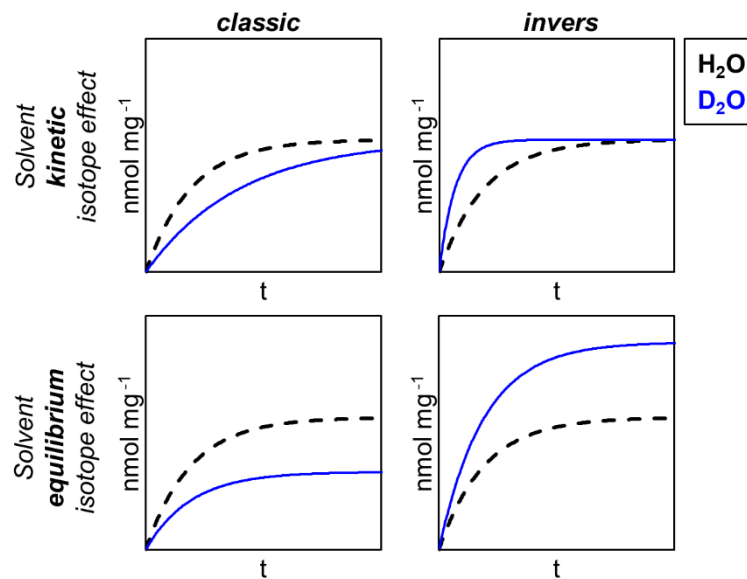


Abbildung 3-27: Schematische Darstellung der Änderung des Verlaufes von Substrat-Aufnahmekurven im verwendeten Hefeassay bei zu beobachtenden *solvent isotope effects* (SIEs) unter Verwendung von D₂O (blaue Linie) im Vergleich zu H₂O (schwarzgestrichelte Linie). Die Auswirkungen sind je für kinetische (*kinetic*) und das Gleichgewicht (*equilibrium*) betreffende Effekte dargestellt. Auch Kombinationen der Effekte sind möglich.

Hierbei spricht man vom *solvent kinetic isotope effect* (SKIE) für kinetische Effekte oder *solvent equilibrium isotope effect* (SEIE) für thermodynamische Effekte, die sich bei Verwendung von schwerem Wasser beobachten lassen. Um diese zu beschreiben, wird immer die Änderung der Ratenkonstante oder der Gleichgewichtslage im schweren Wasser im Vergleich zu den Parametern mit Protonen beobachtet. Verläuft die Reaktion schneller bzw. ist das Gleichgewicht zu Seiten des Produktes verschoben, spricht man vom *inverse solvent isotopic effect* (iSIE) wohingegen eine Verlangsamung der Reaktion und eine Verschiebung des Gleichgewichtes zu Seiten der Edukte einem *classic solvent isotope effect* (cSIE) entspricht. So ergeben sich auch Kombinationsmöglichkeiten von inversen und klassischen SIEs: Etwa iSKIE und cSEIE, etc. (Abbildung 3-27).

Ergebnisse

Schwerwassereffekte auf die Substratpassage durch FNT

Diese lassen sich besonders gut darstellen, betrachtet man das Verhältnis einer Konstante in H₂O zu D₂O: ist dieses größer eins liegt ein klassischer Effekt vor, kleiner eins ein inverser (Anslyn und Dougherty, 2006).

Um die aufgestellten Hypothesen bezüglich der Konstriktionen zu prüfen, wurden Schwerwasser-Experimente am PfFNT-Wildtyp durchgeführt. Das PfFNT wurde gewählt, da es im Vergleich zum EcFocA L-Laktat leitet und so einen niedrigeren Hintergrund während der Messung aufweist und Daten bezüglich des EcFocA teilweise schon erhoben wurden (Wiechert und Beitz, 2017b). Um die SIE zu beobachten, wurden zeitabhängige Aufnahmekurven in Puffern mit derselben Lyonium-Ion-Konzentration (pL entsprechend pH oder pD) aufgenommen und anschließend analog den Aufnahmekurven zur Substratpassage vermessen (2.14, 3.1).

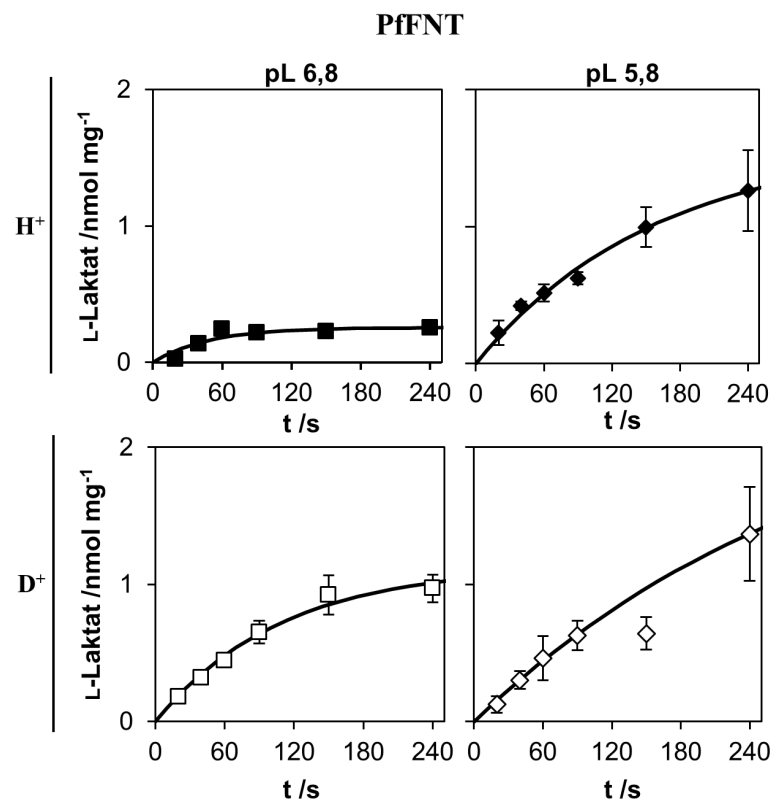


Abbildung 3-28: Zeitabhängige L-Laktat-Aufnahme durch den Wildtyp-PfFNT in H₂O (geschlossene Symbole) oder D₂O (geöffnete Symbole) bei pL 6,8 (Quadrate, links) und 5,8 (Rauten, rechts). N = 2, Fehler stellen S.E.M. dar.

Bei neutralen Bedingungen von pL 6,8 zeigte sich für den Wildtyp der bekannte Kurvenverlauf mit dem Erreichen eines Gleichgewichtszustandes ab ca. 90 s (Abbildung 3-28) der sich mit einer schnellen Ratenkonstante von $(0,021 \pm 0,009) \text{ s}^{-1}$ einstellte (Abbildung 3-29). Bei Verwendung von schwerem Wasser zeigte sich, wie zu erwarten war, ein cSKIE, da die Ratenkonstante mit

Ergebnisse

Schwerwassereffekte auf die Substratpassage durch FNT

($0,0092 \pm 0,001$) s^{-1} deutlich langsamer war, als die bei Verwendung von Protonen. Das Verhältnis der Ratenkonstanten in H_2O zu D_2O lag deutlich über eins (Abbildung 3-29). Für den SEIE zeigte sich ein inverser Effekt: Die absolute Aufnahme in schwerem Wasser lag ca. 4,5-fach über der Aufnahmekapazität in H_2O (H_2O : ($0,25 \pm 0,04$) $nmol\ mg^{-1}$; D_2O : ($1,1 \pm 0,1$) $nmol\ mg^{-1}$). Das Verhältnis der Aufnahmekapazitäten in H_2O zu D_2O war deutlich kleiner eins (Abbildung 3-29).

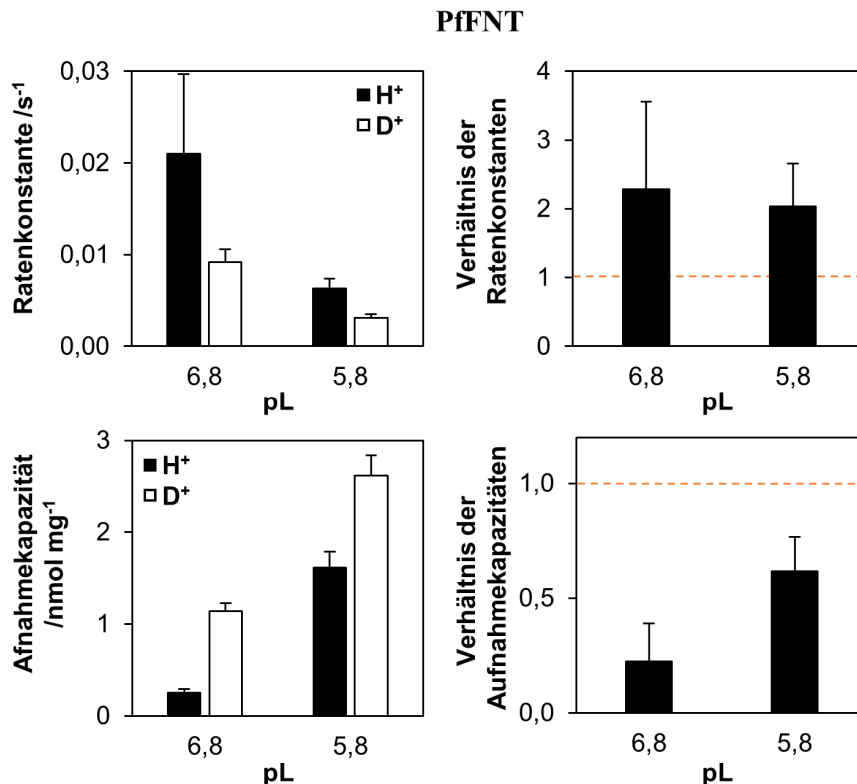


Abbildung 3-29: Ratenkonstanten (oben links), Aufnahmekapazitäten (unten links) abgeleitet aus Aufnahmekurven mit L-Laktat durch PfFNT in H_2O (geschlossene Balken) oder D_2O (geöffnete Balken) bei sinkendem pL. Rechts: Verhältnisse der Konstanten (pH/pD), Werte kleiner eins (gestrichelte orangene Linie) zeigen einen inversen SIE an. $N = 2$, Fehler stellen Standardfehler des Fits dar.

Bei Ansäuern um eine pL-Einheit sank sowohl für Messungen mit Protonen als auch mit Deuteronen die Ratenkonstante (Abbildung 3-28, H_2O : ($0,0063 \pm 0,001$) s^{-1} ; D_2O : ($0,0031 \pm 0,0004$) s^{-1}). Der Unterschied blieb im Vergleich zu pL 6,8 gleich und die Messwerte beschrieben auch hier einen cSKIE, was sich durch ein Verhältnis der Ratenkonstanten von H^+ zu D^+ über eins zeigte (Abbildung 3-29). Die Aufnahmekapazitäten hingegen näherten sich bei Ansäuern an: Bei Verwendung von D_2O bei pL 5,8 wurde nur noch das 1,6-fache im Vergleich zu H_2O aufgenommen und der Effekt des iSEIE verringerte sich (H_2O : ($1,6 \pm 0,2$) $nmol\ mg^{-1}$; D_2O : ($2,6 \pm 0,3$) $nmol\ mg^{-1}$, Abbildung 3-29). Das

Ergebnisse

Erweiterung des Substratspektrums von EcFocA-Varianten durch Konstriktionserweiterung

Verhältnis der Aufnahmekapazitäten in H₂O zu D₂O blieb jedoch kleiner eins (Abbildung 3-29).

3.6 Erweiterung des Substratspektrums von EcFocA-Varianten durch Konstriktionserweiterung

EcFocA-Mutanten mit zwei oder mehr Mutationen in den Konstriktionen zeigten keine Passage für das endogene Substrat, obwohl die Pore deutlich im Durchmesser vergrößert wurde. Zudem wurde bereits die Hypothese aufgestellt, dass durch diese Erweiterung Wasser mit in die Pore eindringen könnte und dieses bei Eröffnung beider Konstriktionen den FNT-Transportpfad vielleicht sogar komplett passieren kann. Um auf eine solche Erweiterung des Substratspektrums durch Erweiterung der Konstriktionen zu prüfen, wurden Schwell- und Schrumpf-Assays mit den die EcFocA-Varianten exprimierenden Hefen durchgeführt (2.16.1). Um sicherzustellen, dass das jeweilig exprimierte Protein keinen Einfluss auf die Zellgröße der exprimierenden Hefen und damit die Ausgangslage der Experimente hat, wurde dies exemplarisch für Hefen die den Wildtyp und die F75A/F202A/L79A/L89A-Variante exprimierten überprüft (Abbildung 3-30).

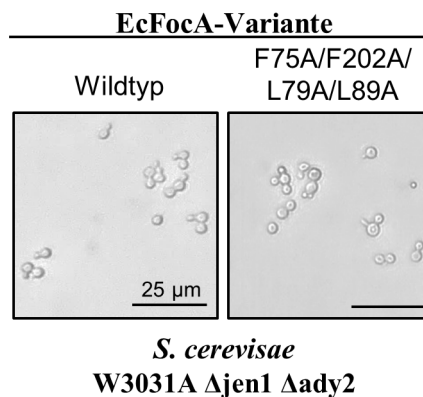


Abbildung 3-30: Größenvergleich der EcFocA-Varianten exprimierenden Hefen W3031A Δ jen1 Δ ady2.

Die Beobachtungen zeigten, dass auch bei Expression von mehrfach mutiertem FNT keine Änderung der Zellgröße zu beobachten war, weshalb für alle Assays dasselbe Ausgangs-Zellvolumen angenommen werden konnte. Zwar zeigte sich, dass nicht alle Zellen einer Kultur gleich groß waren, jedoch wiesen die observierten Proben die gleiche Heterogenität auf, weshalb gleiche Bedingungen angenommen werden konnten.

3.6.1 Wasserpassage durch EcFocA-Varianten nach Konstriktionserweiterung

Es war bereits bekannt, dass trotz der strukturellen Ähnlichkeit von FNT zu AQP Wasser FNT nicht passieren kann (Wang *et al.*, 2009). Zur Prüfung auf Wasserleitfähigkeit nach Konstriktionserweiterung wurde ein etablierter Schwell- und Schrumpf-Assay verwendet (2.16.1) indem Hefeprotoplasten (2.15) einem osmotischen Gradienten ausgesetzt werden. Gelangt dadurch Wasser in die Zellen oder aus ihnen hinaus, ändert sich das Zellvolumen, was über Streulichtintensitäten im 90°-Winkel nachzuverfolgen ist. Die Geschwindigkeit des Schrumpfens und Schwellens zeigt damit indirekt eine Wasserleitfähigkeit an (Abbildung 3-31). Hierzu wurde der Hefestamm BY4742 Δ fps1 mit deletiertem endogenen AQP verwendet, um das Hintergrundsignal klein zu halten.

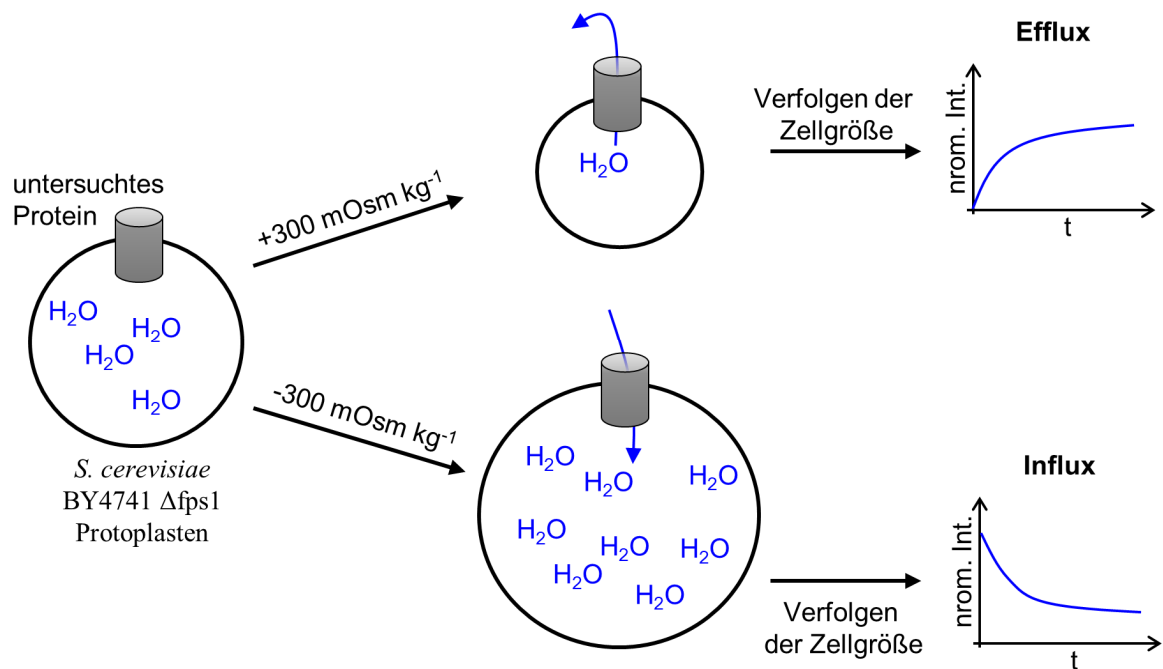


Abbildung 3-31: Schematische Darstellung des Schwell- bzw. Schrumpfassays zur Messung von Influx oder Efflux von Wasser durch untersuchte FNT-Varianten in der Hefe. Die verwendete Zelllinie BY4742 Δ fps1 wies dabei kein endogenes Aquaporin auf. Die Hefen wurden vor dem Assay protoplastiert um die Osmosensibilität zu erhöhen. Durch die Messung der Streulichtintensität der Hefesuspension konnte die Änderung der Zellgröße nachverfolgt werden.

Die Kontrolle der Expression der untersuchten EcFocA-Varianten im verwendeten Hefestamm erfolgte mittels Western-Blot-Analytik (Abbildung 3-32). Analog der Expression im Hefestamm W3031A Δ jen1 Δ ady2, konnten in dem AQP-*knock-out*-Stamm alle Konstrukte außer EcFocA-L89A/F202A exprimiert und in der mikrosomalen Fraktion nachgewiesen werden (Abbildung 3-1). Bestimmungen der Generationszeiten zeigten auch in diesem Hefestamm, dass

Ergebnisse

Erweiterung des Substratspektrums von EcFocA-Varianten durch Konstriktionserweiterung

diese für Kreuz-Mutanten im Vergleich zu denen der Hefen, die andere Varianten exprimierten, erhöht waren (Abbildung 3-32).

Zudem wurden Hefen, die das AQP TbAQP2 exprimierten auf dessen Expression untersucht und als Kontrolle für die Wasserleitfähigkeit eingesetzt. Mit dem verwendeten Anti-HA-Antikörper konnte das TbAQP2 jedoch nicht in der Hefemembran nachgewiesen werden. Da die funktionsfähige Expression im Arbeitskreis jedoch bekannt und überprüft war (Petersen und Beitz, 2020), wurde kein weiterer Western-Blot angefertigt, um die Expression erneut zu bestätigen.

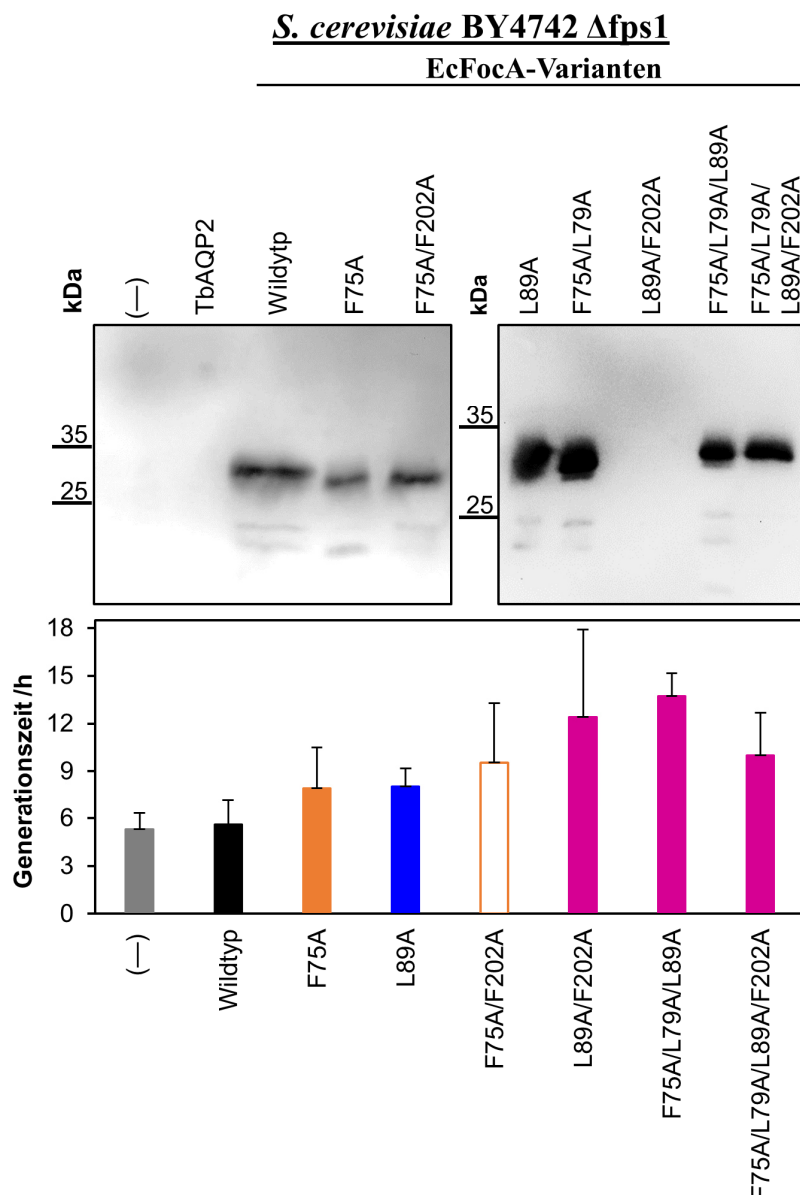


Abbildung 3-32: Western-Blots der mikrosomalen Fraktion eines Zellaufschlusses nach Transformation mit dem entsprechenden Konstrukt von *S. cerevisiae* der Linie BY4742 Δ fps1 nach Trennung per SDS-PAGE zur Expressionskontrolle der FNT-Varianten. Der Nachweis erfolgte durch Anti-HA-Primärantikörper. (-) zeigt den getrennten Aufschluss von Hefen die mit Leerplasmid transformiert waren. Unten: Generationszeiten der Hefen nach Transformation mit den entsprechenden Konstrukten. N = 3, Fehler stellen S.E.M. dar.

Ergebnisse

Erweiterung des Substratspektrums von EcFocA-Varianten durch Konstriktionserweiterung

3.6.1.1 Wasser-Efflux aus EcFocA-Varianten nach Konstriktionserweiterung

Zunächst wurde der Wasser-Efflux durch EcFocA überprüft im Schrumpf-Assay bei hypertonem Milieu untersucht. Die Kurve der EcFocA-exprimierenden Hefen glich der Kurve von Hefen, die mit Leerplasmid transformiert waren und zeigte so die Undurchlässigkeit des FNTs für Wasser (Abbildung 3-33). Um den Kurvenverlauf auch quantitativ zu vergleichen, wurden die τ -Werte der Streulichtkurven bestimmt. Dieser Wert beschreibt den Zeitpunkt, an dem die Kurve einen Wert von $(1 - e^{-1})$ erreicht. Je kleiner der τ -Wert ist, desto schneller leitet das Konstrukt das Wasser aus den Zellen hinaus.

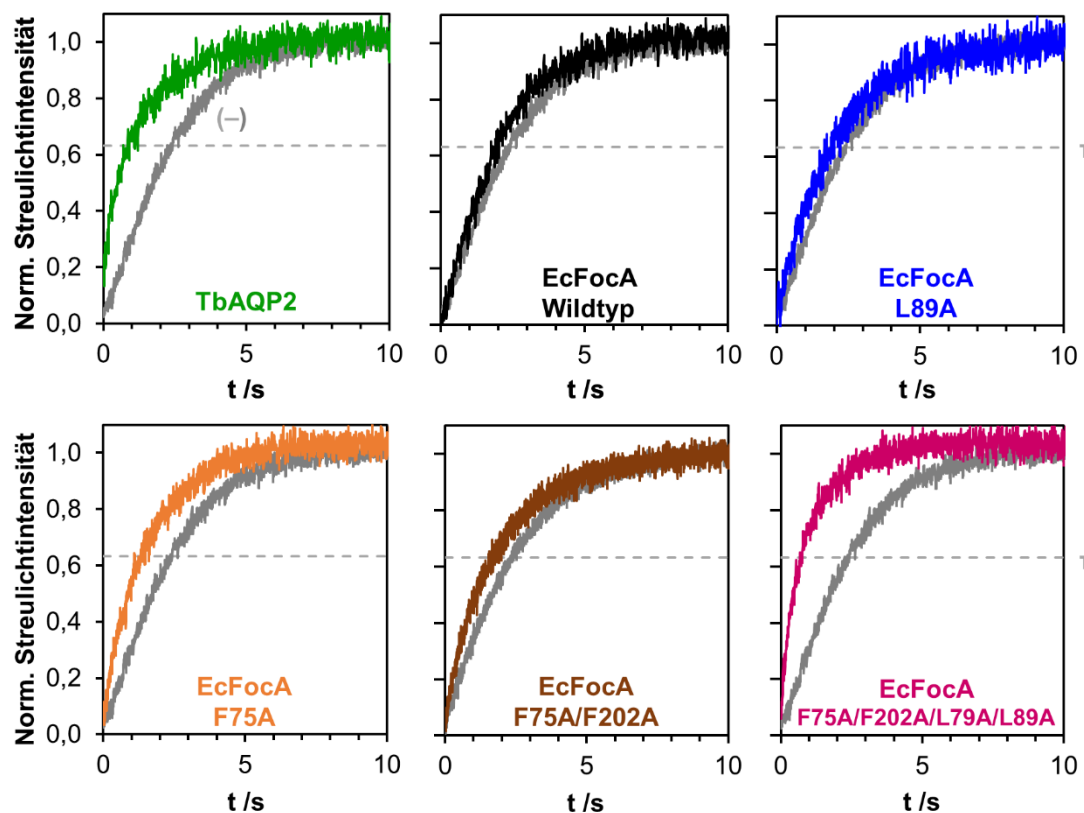


Abbildung 3-33: Schrumpfkurven von Hefen die TbAQP2 (grün), EcFocA (schwarz), die EcFocA-Varianten L89A (blau), F75A (orange), F75A/F202A (braun) oder F75A/F202A/L79A/L89A (pink) oder kein heterologes Protein (grau) exprimieren. Der τ -Schwellenwert ist gestrichelt eingezeichnet. Gezeigt ist die Mittelung aus sechs bis neun technischen Replikaten, deren Ergebnis mit $N = 3$ bestätigt wurde.

Wie zu erwarten, glichen sich der τ -Wert von mit Leerplasmid transformierten Hefen von $(2,3 \pm 0,3)$ s und EcFocA $(2,6 \pm 0,3)$ s, während der τ -Wert des TbAQP2 mit $(1,5 \pm 0,4)$ s knapp 40 % erniedrigt war und somit die Wasserleitfähigkeit über das AQP anzeigte (Abbildung 3-34).

Als nächstes wurden zwei EcFocA-Varianten mit eröffneter exoplasmatischer Konstriktion untersucht. Erneut wurden die F75A- und F75A/F202A-Varianten

Ergebnisse

Erweiterung des Substratspektrums von EcFocA-Varianten durch Konstriktionserweiterung

gewählt, da sie die größte Erweiterung der Pore darstellten die noch Formiatpassage erlaubten. Beide Mutanten zeigten bereits eine zum Hintergrundsignal ca. 30 % erniedrigten τ -Wert für den Ausstrom von Wasser mit F75A: ($1,5 \pm 0,2$) s und F75A/F202A: ($1,7 \pm 0,2$) s (Abbildung 3-33). Eine Wasserleitfähigkeit des modulierten FNT war demnach zu beobachten.

Die Untersuchung der L89A-Variante, die in der zytoplasmatischen Konstriktion eröffnet war, zeigte ebenfalls die Passage von Wasser. Dieser war jedoch mit ($2,0 \pm 0,2$) s nicht so schnell wie für die bereits erwähnten Mutanten mit eröffneter exoplasmatischer Konstriktion (Abbildung 3-34).

Die Quadrupel-Mutante des EcFocA, F75A/F202A/L79A/L89A, zeigte ebenfalls eine Wasserleitfähigkeit und wies von allen untersuchten EcFocA-Varianten die schnellste Wasserleitfähigkeit auf. Der τ -Wert lag mit ($1,0 \pm 0,2$) s sogar unter dem des als PK getesteten TbAQP2 (Abbildung 3-34).

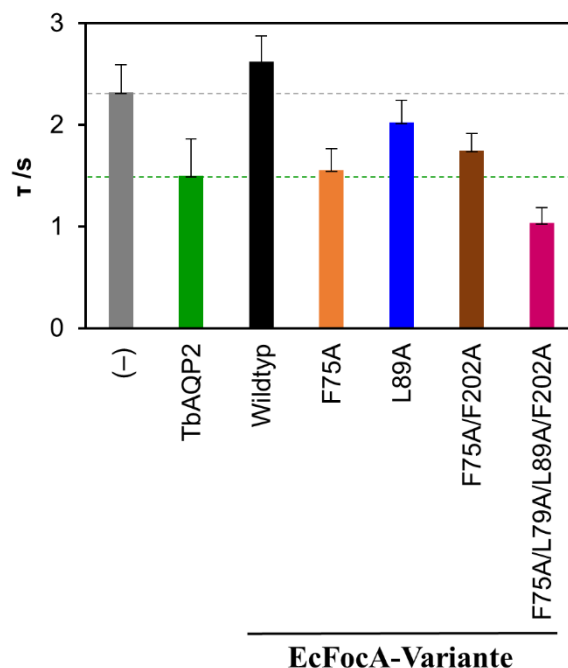


Abbildung 3-34: τ -Werte der Wasserleitfähigkeit für Hefen, die EcFocA-Varianten exprimierten, im Vergleich zu Hefen transformiert mit Leerplasmid (-) (grau) und solchen die TbAQP2 exprimierten (grün). N = 3, Fehler stellen S.E.M. dar.

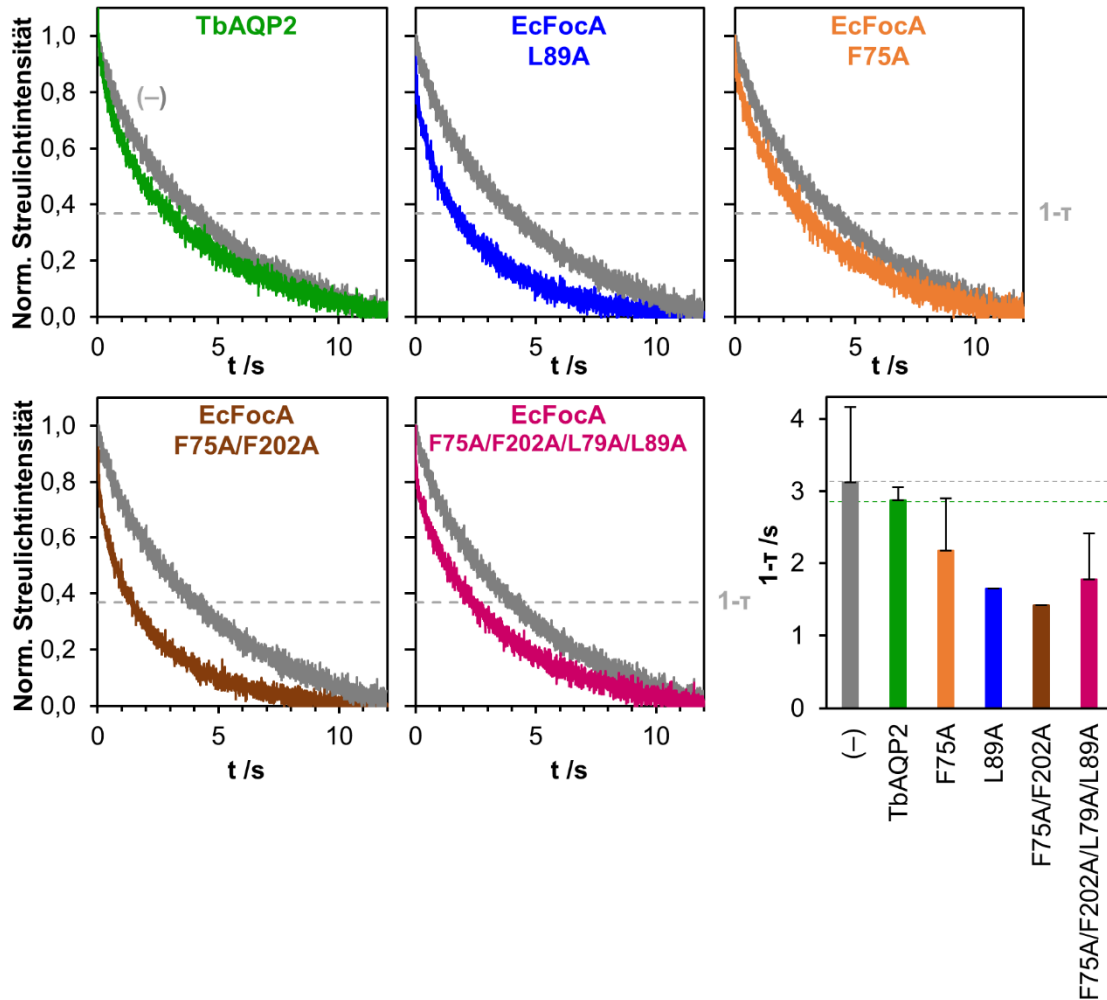
3.6.1.2 Wasser-Influx aus EcFocA-Varianten nach Konstriktionserweiterung

Diese Beobachtung der Wasserleitfähigkeit durch FNT nach Eröffnung der Konstriktionen sollte durch die Umkehr des Gradienten bestätigt werden. Zudem sollte analog der endogenen Substratpassage überprüft werden, ob FNT stets als bidirektionaler Kanal rein gradientengetrieben leiten, oder ob die Mutation in nur

Ergebnisse

Erweiterung des Substratspektrums von EcFocA-Varianten durch Konstriktionserweiterung

einer Konstriktion die Direktionalität bedingt (Abbildung 3-13). Dazu wurden die das jeweilige FNT exprimierende Hefeprotoplasten in hypotonen Puffer gegeben, um den Gradienten für Wasser umzukehren und das Schwellverhalten über die Streulichtintensität nachverfolgt (Abbildung 3-31).



EcFocA-Variante

Abbildung 3-35: Schwellkurven von Hefen die TbAQP2 (grün, N = 2), die EcFocA-Varianten L89A (blau, N = 1), F75A (orange, N = 2), F75A/F202A (braun, N = 1) oder F75A/F202A/L79A/L89A (pink, N = 2) oder kein heterologes Protein (-) (grau, N = 2) exprimierten. Der $(1 - \tau)$ -Schwellenwert ist gestrichelt eingezeichnet. Gezeigt ist die Mittelung aus sechs bis neun technischen Replikaten. Unten rechts: $(1 - \tau)$ -Werte der Wasserleitfähigkeit in Import-Richtung. Fehler stellen S.E.M. dar.

Die Passage von Wasser durch EcFocA-Varianten konnte so auch in umgekehrter Richtung gezeigt werden (Abbildung 3-35), wobei zum Vergleich analog dem Influx der Zeitpunkt herangezogen wurde, an dem $(1 - \tau)$ erreicht wurde. Erneut zeigten Hefeprotoplasten mit moduliertem EcFocA oder TbAQP2 nachdem sie einem hypotonen Gradienten ausgesetzt wurden, eine schnellere Änderung des Zellvolumens als die Hefen, die kein Protein heterolog exprimierten mit $(1 - \tau)$ von $(3,1 \pm 1,0)$ s. Jedoch war der Unterschied zwischen TbAQP2 und

Ergebnisse

Erweiterung des Substratspektrums von EcFocA-Varianten durch Konstriktionserweiterung

Hefen die kein Protein heterolog exprimierten bei diesen Assay-Bedingungen nicht so deutlich wie bei hypertonem Gradienten, denn das TbAQP2 zeigte einen $(1 - \tau)$ -Wert von $(2,9 \pm 0,2)$ s. Zudem war der gemessene Wasser-Influx langsamer als der Efflux.

Für die Mutanten mit eröffneter exoplasmatischer Konstriktion, d.h. für EcFocA-F75A und -F75A/F202A, war für den Efflux eine schnellere Leitfähigkeit als für das TbAQP2 zu beobachten ($(2,2 \pm 0,7)$ s und 1,4 s). Die Mutante mit einfacher Mutation in zytoplasmatischer Konstriktion, EcFocA-L89A, wies ebenfalls eine schnellere Wasserleitfähigkeit als das TbAQP2 auf (1,7 s) und erreichte zusammen mit der F75A/F202A- und F75A/F202A/L79A/L89A-Mutante ($(1,8 \pm 0,6)$ s) den niedrigsten $(1 - \tau)$ -Wert. Es ist zu bemerken, dass für einige Messungen nur ein biologisches Replikat angefertigt wurde und deshalb kein Fehler angegeben werden kann (Abbildung 3-35).

3.6.1.3 Wasser-Efflux aus EcFocA-Varianten nach Konstriktionserweiterung in Anwesenheit des endogenen Substrates

Die Quadrupelmutante leitete im radio-Assay kein endogenes Substrat (τ), aber Wasser. Um zu prüfen, ob das endogene Substrat die Passage durch die erweiterte EcFocA-Pore unterbindet, wurde die Wasserpassage in Anwesenheit von endogenem FocA-Substrat überprüft. Dazu wurden Hefeprotoplasten über Nacht mit 10 mM Formiat, Acetat oder Propionat inkubiert, und dann auf Wasserleitfähigkeit geprüft. Hierbei stellen Formiat und Acetat endogene Substrate des EcFocA dar. Für das Propionat ist nicht bekannt, ob es ein FNT-Substrat ist, es stellt aber das nächstgrößere unverzweigte Monocarboxylat dar. Die Hefeprotoplasten wurden nach der Inkubation analog der Wasser-Export Messungen behandelt (3.6.1.1).

Hierbei zeigten Protoplasten mit der Quadrupel EcFocA-Variante in der Membran bei der Kontrollmessung von Inkubation in Puffer ohne Zusätze erneut einen schnelleren Wasserausstrom als Hefen ohne Expression eines heterologen Proteins (Abbildung 3-36). Der τ -Wert dieses Hintergrundsignal blieb auch stets auf demselben Niveau, egal mit welcher Substanz vorinkubiert wurde. Dies zeigte, dass die Monocarboxylate keinen Effekt auf die Protoplasten während der Vorinkubation hatten.

Ergebnisse

Erweiterung des Substratspektrums von EcFocA-Varianten durch Konstriktionserweiterung

Für die FNT-Mutanten exprimierenden Protoplasten blieb der τ -Wert allerdings auch unabhängig von einer Vorinkubation konstant, so dass ein Effekt der Porenverstopfung durch das endogene Substrat Formiat oder Acetat ausblieb. Selbst das größere Propionat konnte die Porenverstopfung für Wasser nicht herbeiführen (Abbildung 3-36).

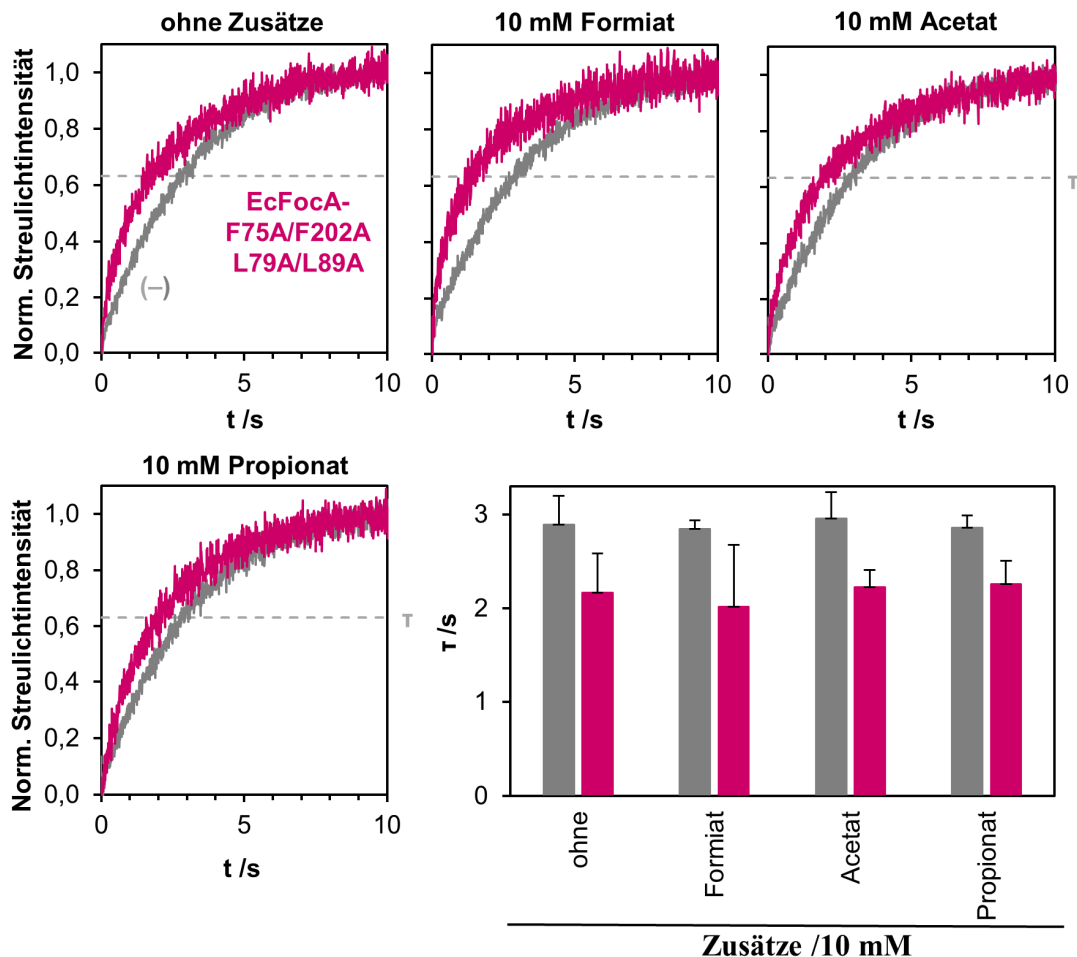


Abbildung 3-36: Schrumpfkurven von Hefen die EcFocA-F75A/F202A/L79A/L89A (pink) oder kein heterologes Protein (-) (grau) exprimieren. Der τ -Schwellenwert ist gestrichelt eingezeichnet. Mittelung aus sechs bis neun technischen Replikaten gezeigt, mit $N = 2$ bestätigt.

3.6.2 Protonen-Passage durch EcFocA-Varianten nach Konstriktionserweiterung

Klassische wasserleitende Kanäle schließen Protonen aus (Beitz *et al.*, 2006). Dem gegenüber stand für die wasserleitenden EcFocA-Varianten die Hypothese der Protonierung des zentralen Histidins, da eine AQP-ähnliche Wasserleitfähigkeit die Passage von Protonen verhindern würde (Murata *et al.*, 2000). So sollte als nächstes geprüft werden, ob Protonen mit dem Wasser durch das erweiterte EcFocA mit erzeugter Wasserleitfähigkeit gelangen können.

Ergebnisse

Erweiterung des Substratspektrums von EcFocA-Varianten durch Konstriktionserweiterung

Um das Passieren von Protonen zu prüfen, wurde ein neuer Assay entwickelt, bei dem die Hefeprotoplasten mit dem Fluoreszenz-pH-Indikator 6-FAM beladen wurden. Dieser verliert mit Sinken des pH-Wertes, auch innerhalb von Hefezellen, an Fluoreszenzintensität (Bracey *et al.*, 1998). Gelangen Protonen in die beladenen Hefen, senkt sich demnach das gemessene Fluoreszenzsignal der Probe (Abbildung 3-37). So wurden Hefeprotoplasten, die EcFocA-Wildtyp oder die Quadrupel-Mutante EcFocA-F75A/F202A/L79A/L89A exprimierten, vermessen (2.16.2). Es wurden Protoplasten generiert und vermessen, um die Bedingungen den Experimenten zur Wasserleitfähigkeit gleich zu halten.

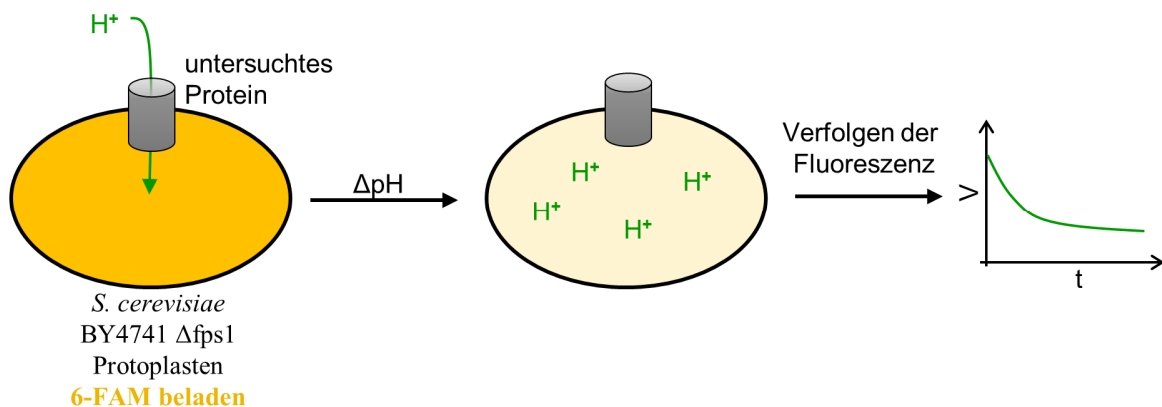


Abbildung 3-37: Schematische Darstellung des Fluoreszenz-Assays zur Messung von Protonenfluss durch untersuchte FNT-Varianten in der Hefe. Die verwendete Zelllinie BY4742 $\Delta fps1$ wies dabei kein endogenes Aquaporin auf. Die Hefen wurden mit dem Fluoreszenz-pH-Indikator 6-FAM (gelb) beladen, protoplastiert und einem pH-Gradienten ausgesetzt. Können durch das untersuchte Protein Protonen in die Hefen gelangen, nimmt das Fluoreszenzsignal ab.

Für Hefeprotoplasten die mit Leerplasmid oder dem Plasmid kodierend für das Wildtypprotein transformiert waren, waren lediglich Spannungsänderungen, die die Änderung der Fluoreszenzintensität abbilden (Abbildung 3-37), um 0,3 V zu vermerken. Die initiale Rate aus dem Fit durch die gemessenen Datenpunkte belief sich für den EcFocA-Wildtyp nach Abzug des Hintergrundsignals auf $(0,045 \pm 0,018) \text{ s}^{-1}$. Für die EcFocA-Quadrupelmutante hingegen war eine deutliche Abnahme des Fluoreszenzsignals nach Anlegen des Protonengradienten durch die Änderung der gemessenen Spannung am Photomultiplier zu vermerken. Die Änderung betrug über 1 V und die initiale Rate aus dem Fitting durch die gemessenen Datenpunkte belief sich nach Abzug des Hintergrundsignals auf $(0,38 \pm 0,23) \text{ s}^{-1}$. Dies entspricht der neunfachen Rate des Wildtyps. So wurde geschlussfolgert, dass durch die Eröffnung beider Konstriktionen ein Protonenstrom durch das FNT möglich ist.

Ergebnisse

Erweiterung des Substratspektrums von EcFocA-Varianten durch Konstriktionserweiterung

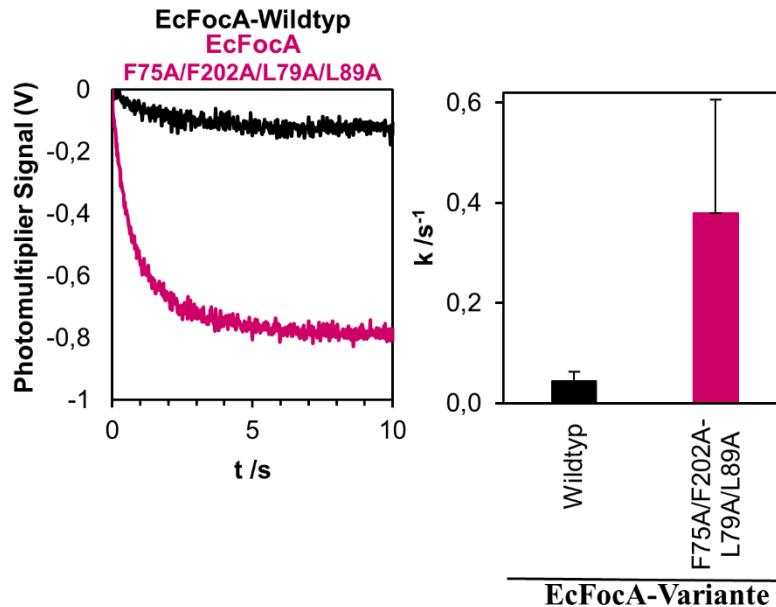


Abbildung 3-38: Änderung der gemessenen Fluoreszenzintensität von mit 6-FAM beladenen Hefeprotoplasten, die den EcFocA-Wildtyp (N = 2) oder die F75A/F202A/L79A/L89A-Mutante (N = 3) exprimierten, nach Anlegen eines Protonengradienten von $\Delta\text{pH} = 1$. Das Hintergrundsignal wurde abgezogen (N = 3). Gezeigt ist eine Mittelung aus sechs bis neun technischen Replikaten. Rechts: Abgeleitete initiale Raten k für die Protonenleitfähigkeit, Fehler stellen S.E.M. dar.

3.6.3 Passage von neutralem Methylamin durch EcFocA-Varianten nach Konstriktionserweiterung

Ein weiteres Substrat, das auf Passage durch die eröffneten EcFocA-Mutanten geprüft wurde, war Methylamin. Durch einen phänotypischen Detoxifizierungs-Assay kann der Export des zytotoxischen Stoffes aus Hefezellen beobachtet werden und so auf die Passage des Methylamins durch das jeweilig exprimierte Protein rückgeschlossen werden. Ohne methylaminleitendes Membranprotein ist das Wachstum der Hefezellen in diesem Assay gehindert. Ein Anwachsen der Hefen zeigt demnach die Passage von Methylamin an (Abbildung 3-39, Wu *et al.*, 2008). Um das Hintergrundsignal möglichst gering zu halten, wurden Hefen mit deletiertem endogenem AQP (Fps1) und Glyceroltransporter (Stl1) für den Detoxifizierungsassay verwendet.

Ergebnisse

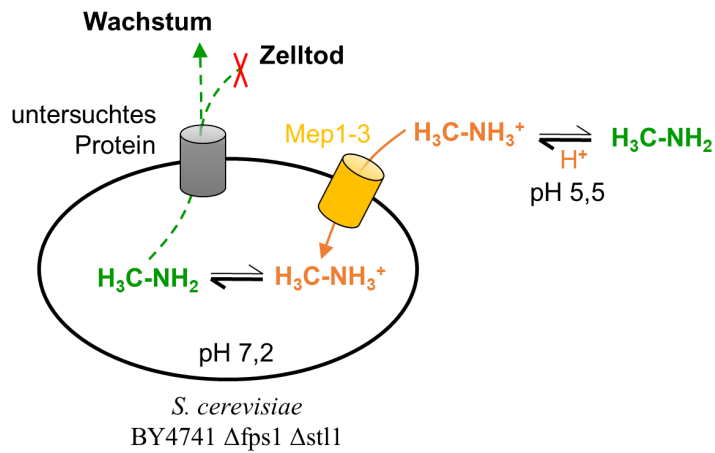


Abbildung 3-39: Schematische Darstellung des Detoxifizierungs-Assays zur phänotypischen Beobachtung von einer Methylaminpassage durch untersuchte FNT-Varianten in der Hefe. Die verwendete Zelllinie BY4741 Δ fps1 Δ stl1 wies dabei keine endogenen Wasser- oder Glycerol-Kanäle auf. Die Hefen nehmen das im Medium protonierte Methylamin über die endogenen Ammoniumtransporter Mep1-3 auf. Im Zytosol wird dieses neutralisiert. Nur wenn das jeweilig heterolog exprimierte Protein dieses neutrale Methylamin leiten kann, kann dieser zytotoxische Stoff wieder ausgeschleust werden und die Zellen können anwachsen.

Die Expression in der Zelllinie BY4741 Δ fps1 Δ stl1 konnte für die untersuchten Konstrukte mittels Western-Blot-Analytik bestätigt werden (Abbildung 3-40). In dieser Zelllinie konnte, im Vergleich zu anderen verwendeten Hefestämmen in anderen Experimenten, auch ein Signal für die EcFocA-L89A/F202A-Variante detektiert und damit untersucht werden. Auch die Generationszeiten der diese Variante exprimierenden Hefen war näher im Bereich der Hefen, die andere Kreuz-Mutanten exprimierten. Erneut wurde für das TbAQP2 keine Bande im durchgeführten Western-Blot-Experiment nachgewiesen, aber die beobachtete Funktion ließ erneut auf den erfolgreichen Einbau in der Membran rückschließen.

Nach serieller Verdünnung der entsprechend transformierten Hefesuspensionen auf SD-Kontrollmedium und Methylamin-Medium (pH 5,5) wurden die Kulturschalen bis zum sichtbaren Anwachsen von Hefen die TbAQP2 exprimierten, welches Methylamin leiten kann, inkubiert. Auf den SD-Kontrollplatten zeigten alle Kolonien auch bei 1000-facher Verdünnung ein ähnliches Wachstum durch sichtbare Koloniebildung (Abbildung 3-41). Dadurch wurde die Unversehrtheit der Zellen, die für das Experiment verwendet wurden, bestätigt.

Ergebnisse

Erweiterung des Substratspektrums von EcFocA-Varianten durch Konstriktionserweiterung

S. cerevisiae BY4741 Δ fps1 Δ stl1

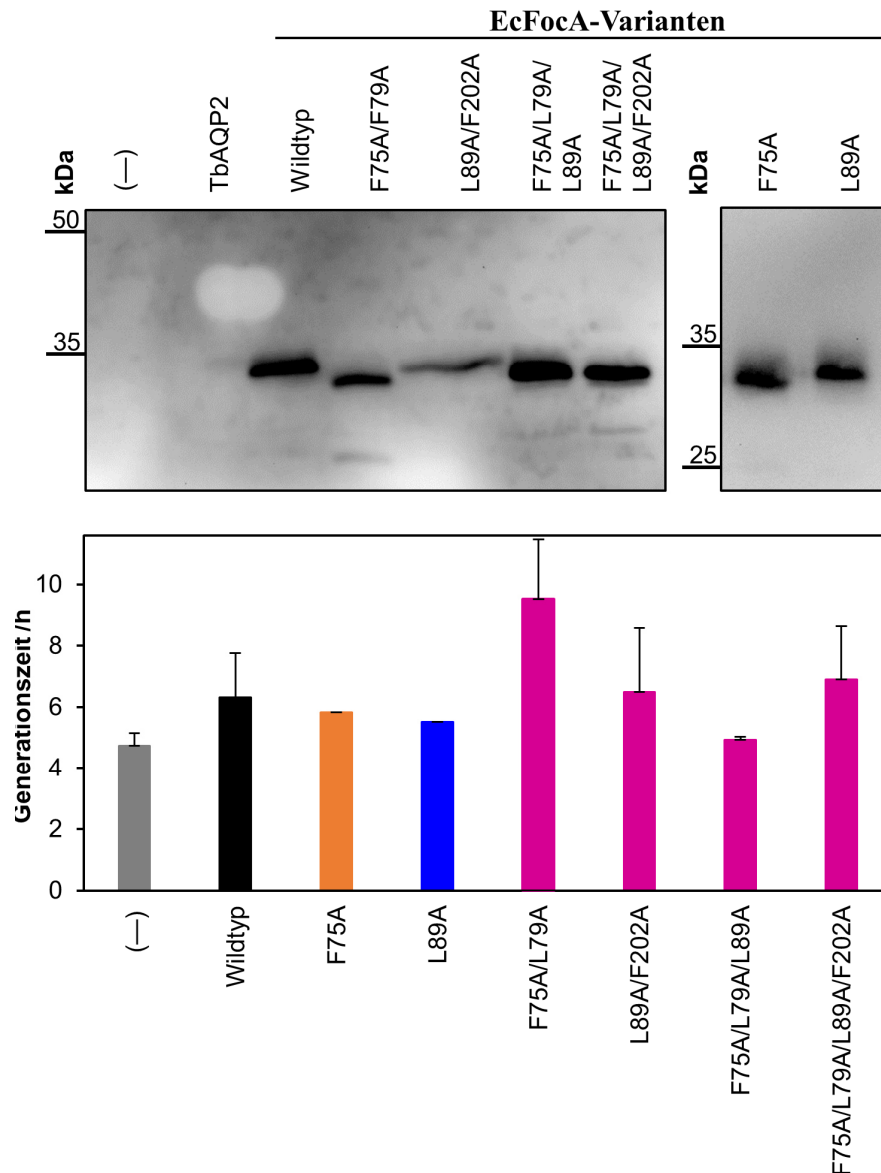


Abbildung 3-40: Western-Blots der mikrosomalen Fraktion eines Zellaufschlusses nach Transformation mit dem entsprechenden Konstrukt von *S. cerevisiae* der Linie BY4741 Δ fps1 Δ stl1 nach Trennung per SDS-PAGE zur Expressionskontrolle der FNT-Varianten. Der Nachweis erfolgte durch Anti-HA-Primärantikörper. (-) zeigt den getrennten Aufschluss von Hefen, die mit Leerplasmid transformiert wurden. Unten: Generationszeiten der Hefen nach Transformation mit den entsprechenden Konstrukten, N = 1-3, Fehler stellen S.E.M. dar.

Auf dem Methylamin-Selektionsagar wuchsen bereits ab der unverdünnten Reihe nicht alle Hefen gleichermaßen. Ab dem ersten Verdünnungsschritt zeigten Hefen, die die EcFocA-F75A-Variante exprimierten, ein sichtbar vermindertes Wachstum. Ab dem zweiten Verdünnungsschritt wuchsen auch Hefen die mit Leerplasmid transformiert waren, Hefen die den EcFocA-Wildtyp oder die EcFocA-L89A- und -F75A/L79A-Variante exprimierten deutlich weniger gut. Die Expression weiterer getesteter Konstrukte (TbAQP2,

Ergebnisse

Erweiterung des Substratspektrums von EcFocA-Varianten durch Konstriktionserweiterung

EcFocA-L89A/F202A, -F75A/L79A/L89A und -F75A/L79A/L89A/F202A) führte jedoch bis zur 1000-fachen Verdünnungen zu sichtbarem Koloniewachstum (Abbildung 3-41). Dies zeigte, dass die Einfach-Mutanten keine Methylaminpassage ermöglichten, analog dem EcFocA-Wildtyp, und den Hefen die kein Protein heterolog exprimierten.

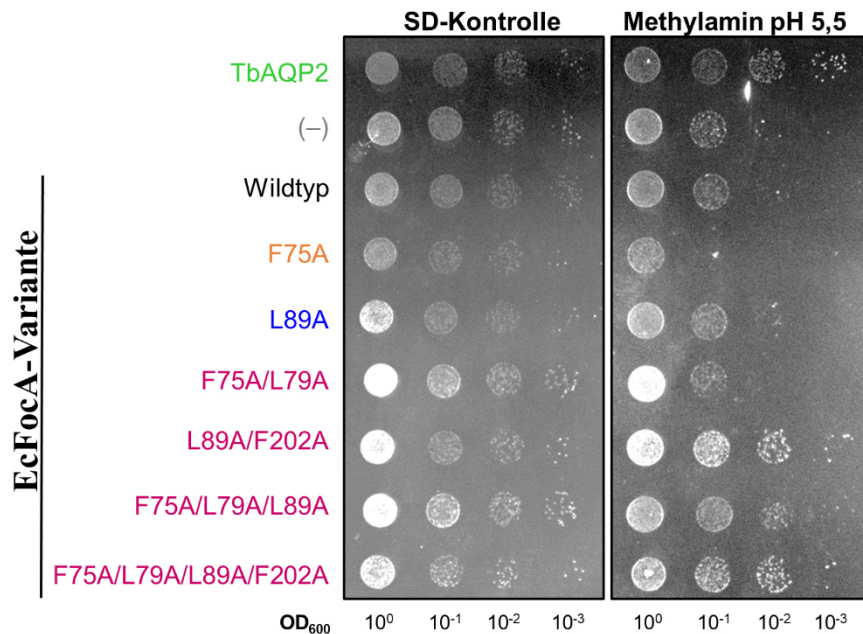


Abbildung 3-41: Serielle Verdünnung von Hefesuspensionen auf festem SD-Kontroll-Medium (links) und Methylamin-Medium (25 mM, pH 5,5, rechts). Die Hefen exprimierten EcFocA-Varianten mit Eröffnung der Konstriktionen (exoplasmatisch: F75A (orange), zytoplasmatisch: L89A (blau), Kreuz: F75A/L79A, L89A/F202A, F75A/L79A/L89A, F75A/L79A/L89A/F202A (pink)), TbAQP2 (grün) oder kein heterologes Protein (-) (grau). Die einfache Durchführung des Experimentes ist gezeigt und wurde mit N = 3 bestätigt.

Für die EcFocA-F79A/L89A-Variante konnte in einem biologischen Replikat ebenfalls die Passage von neutralem Methylamin beobachtet werden (Abbildung 3-42). So zeigten alle getesteten Kreuz-Mutanten des EcFocA und das TbAQP2 eine Passage des neutralen Methylamin.

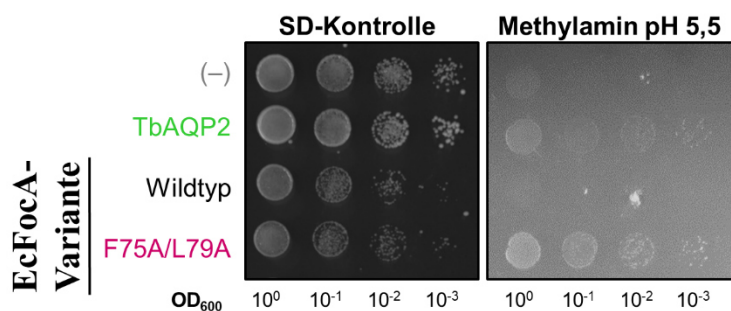


Abbildung 3-42: Serielle Verdünnung von Hefesuspensionen auf festem SD-Kontroll-Medium (links) und Methylamin-Medium (25 mM, pH 5,5, rechts). Die Hefen exprimierten den EcFocA-Wildtyp (schwarz) und die F75A/L79A-Variante (pink) TbAQP2 (grün) oder kein heterologes Protein (-) (grau). Einfache Durchführung des Experimentes gezeigt, mit N = 2 bestätigt.

3.6.4 Passage von protoniertem Methylamin durch EcFocA-Varianten nach Konstriktionserweiterung

Der bereits verwendete Methylaminassay wurde abgewandelt, um nicht auf die Passage von neutralem, sondern von protoniertem, positiv geladenen Methylamin zu testen. Hierbei wurde auf die Aufnahme des kationischen Substrates geprüft und nicht auf das Ausschleusen des Neutralteilchens. Kann protoniertes Methylamin entlang des Konzentrationsgradienten aufgenommen werden, wird es im Zytosol neutralisiert und verbleibt dort nach dem Prinzip der Ionenfalle. Dadurch sterben die Zellen, die ein Protein exprimieren welches kationisches Methylamin leiten kann, ab (Abbildung 3-14).

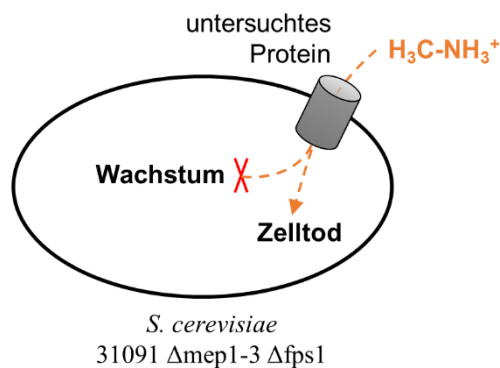


Abbildung 3-43: Schematische Darstellung des Intoxikations-Assays zur phänotypischen Beobachtung einer Aufnahme von protoniertem Methylamin durch untersuchte FNT-Varianten in der Hefe. Die Zelllinie 31091b Δ mep1-3 Δ fps1 weist keine Kanäle für das protonierte oder neutrale Methylamin auf, und ist damit optimal für den Assay. Sind die heterolog exprimierten Proteine in der Lage, protoniertes Methylamin zu leiten, gelangt dieses entlang des Konzentrationsgradienten in die Zellen und führt zum Zelltod oder zu verlangsamtem Wachstum.

Es sollte die Zelllinie 31091b Δ mep1-3 Δ fps1 verwendet werden, der neben dem Gen für das endogene Hefe-AQP Fps1 auch die Gene für die drei endogenen Ammonium-Transporter Mep1-3 deletiert aufweist. Zudem sollte zur Beobachtung von Kationenleitfähigkeit ein ausreichend hoher pH gewählt werden (Krenc *et al.*, 2013). So soll der Hintergrund minimiert werden, da über Fps1 ggf. neutrales Methylamin mit in die Zellen hinein- oder wieder hinausgelangt bzw. über die Ammoniumkanäle Mep-1, -2 oder -3 das kationische Methylamin das Zytosol in jedem Falle erreicht. Dieser Hefestamm stand jedoch nicht naiv zur Verfügung, weshalb der Stamm 31091b Δ mep1-3, der noch das intakte fps1-Gen aufweist, verwendet wurde.

Ergebnisse

Erweiterung des Substratspektrums von EcFocA-Varianten durch Konstriktionserweiterung

S. cerevisiae 31091b Δ mep1-3

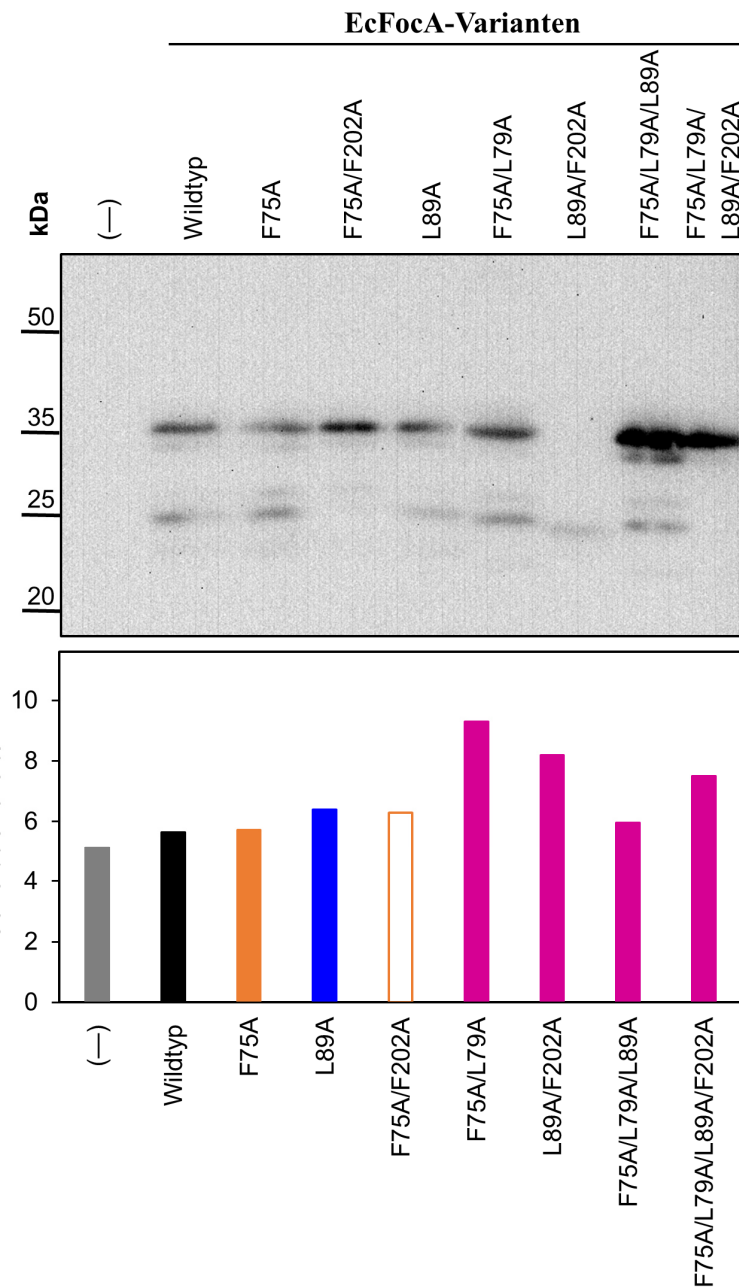


Abbildung 3-44: Oben: Western-Blots der mikrosomalen Fraktion eines Zellaufschlusses nach Transformation mit dem entsprechenden Konstrukt von *S. cerevisiae* der Linie 31091b Δ mep1-3 nach Trennung per SDS-PAGE zur Expressionskontrolle der FNT-Varianten. Der Nachweis erfolgte durch Anti-HA-Primärantikörper. (-) zeigt den getrennten Aufschluss von Hefen die mit Leerplasmid transformiert waren. Unten: Generationszeiten der Hefen nach Transformation mit den entsprechenden Konstrukten, N = 1.

Die Expressionskontrolle der EcFocA-Varianten in diesem Stamm erfolgte mittels Western-Blot-Analytik (Abbildung 3-44). Hierbei zeigte sich, wie bei anderen in dieser Arbeit verwendeten Hefelinien, dass die Kreuz-Mutante EcFocA-L89A/F202A nicht intakt, sondern nur als Abbruchfragment nachweisbar war. Wie in anderen Hefezelllinien lagen die Generationszeiten der Kreuz-Mutanten

Ergebnisse

Erweiterung des Substratspektrums von EcFocA-Varianten durch Konstriktionserweiterung

exprimierenden Hefen über denen der anderen, aber der Effekt war in dieser Zelllinie weniger deutlich ausgeprägt (Abbildung 3-44).

Für Hefen, die kein Protein heterolog exprimierten, wurde ein deutliches Hefewachstum auf festem Methylaminmedium mit pH 7,5 erwartet. Hefen, die mit dem Gen für den Ammoniumtransporter aus der Tomate, LeAMT1;1, transformiert waren, sollten die Aufnahme von kationischem Methylamin anzeigen. Hier wurde ein deutlich vermindertes Hefewachstum erwartet, da dieser Kanal das Ammoniumanalogon leiten kann (Ludewig *et al.*, 2002). Eine weitere Kontrolle stellten Hefen, die das TbAQP2 exprimierten, dar. Das TbAQP2 kann lediglich neutrale Teilchen wie das neutrale Methylamin leiten und sollte somit ebenfalls gut auf festem Methylaminmedium mit pH 7,5 wachsen. Die beiden Kontrollen LeAMT1;1 und TbAQP2 konnten nicht mittels Western-Blot-Technik nachgewiesen werden, die intakte Expression und Funktion in der Hefe war jedoch bereits in anderen Studien gezeigt (Krenc, 2012; Petersen und Beitz, 2020) und die korrekte Gensequenz des zur Transformation verwendeten Plasmids wurde durch Sequenzierung bestätigt (2.7).

Jedoch wurde wider Erwarten weiterhin ein Wachstum für Hefen, die LeAMT1;1 exprimierten, festgestellt werden (Abbildung 3-45). Das Wachstum dieser Hefen unterschied sich erst im letzten Verdünnungsschritt deutlich von Hefen, die kein Protein heterolog exprimierten, welche in allen Verdünnungen deutliches Wachstum auf den Selektionsplatten zeigte. Das TbAQP2 weist eine hohe Leitfähigkeit für das neutrale Methylamin aber keine für das kationische auf (Uzcátegui *et al.*, 2018; Abbildung 3-41). Hefen, die das TbAQP2 exprimierten, wuchsen von allen getesteten Konstrukten am deutlichsten auf Selektionsmedium.

Für das untersuchte EcFocA sowie für die Einfach-Mutanten F75A und L89A zeigte sich ein deutliches Wachstum der mit den entsprechenden Plasmiden transformierten Hefen auf Kontroll- und dem Selektionsagar. Ab dem zweiten Verdünnungsschritt zeigte sich ein abgeschwächtes Wachstum gegenüber den Hefen die kein Protein heterolog exprimierten (Abbildung 3-45). Für die Kreuz-Mutanten des EcFocA zeigte sich wildtypähnliches Wachstum auf Kontroll-Agar. Auf dem Methylamin-Selektionsmedium mit einem pH von 7,5 zeigte sich hingegen kein Anwachsen. Lediglich die F75A/L79A- und die F75A/L79A/L89A-Variante zeigten in der unverdünnten Reihe noch schwaches Wachstum. Dies lässt die

Ergebnisse

Erweiterung des Substratspektrums von EcFocA-Varianten durch Konstriktionserweiterung

Interpretation zur vermehrten Aufnahme des kationischen Methylamins zu, welches dann nicht ausreichend aus den Hefen geschleust werden kann.

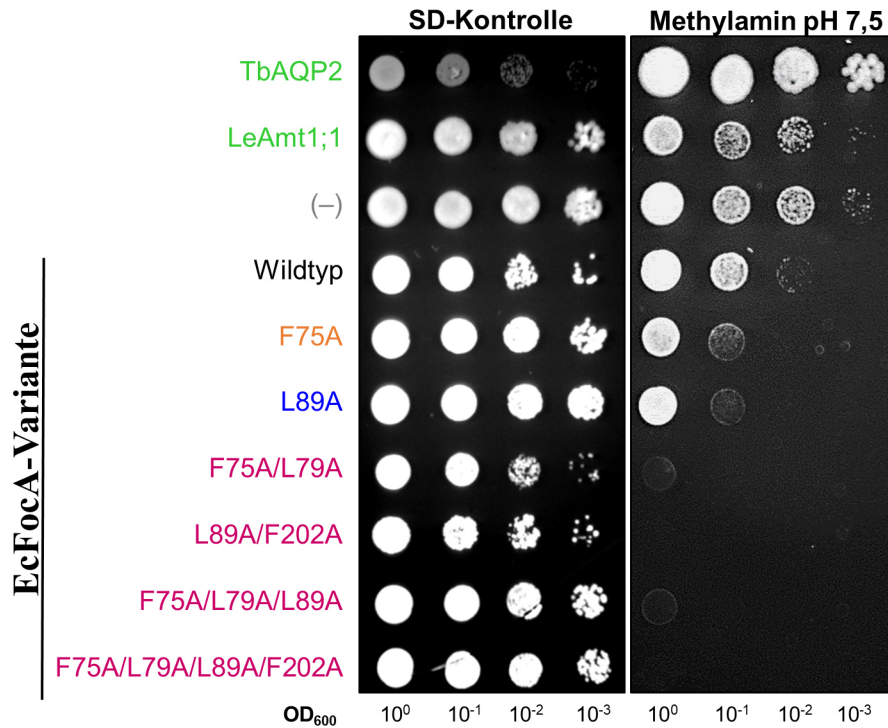


Abbildung 3-45: Serielle Verdünnung von Hefesuspensionen auf festem SD-Kontroll-Medium (links) und Methylamin-Medium (25 mM, pH 7,5, rechts) für den phänotypischen Assay zur Prüfung auf die Passage von protoniertem Methylamin durch EcFocA-Varianten nach Eröffnung der Konstriktionen. Exoplasmatisch: F75A (orange), zytoplasmatisch: L89A (blau), Kreuz: F75A/L79A, L89A/F202A, F75A/L79A/L89A, F75A/L79A/L89A/F202A (pink) im Vergleich zu Hefen die kein Protein heterolog exprimierten (-) (grau) und Hefen die LeAMT1;1 und TbAQP2 exprimierten (grün). Die einfache Durchführung des Experimentes ist gezeigt, wurde mit N = 3 bestätigt.

3.6.5 Glycerol-Passage durch EcFocA-Varianten nach Konstriktionserweiterung

Mit dem Radio-Assay (2.14) konnte auch auf die Passage von Glycerol nach Konstriktionserweiterung untersucht werden. Die Messung erfolgte in dem Monocarboxylat-*knock-out*-Stamm W3031A Δ jen1 Δ ady 2, für den die Expression der getesteten Konstrukte bereits bekannt war (Abbildung 3-1). Hefen, die TbAQP2 exprimierten, welches Glycerol leiten kann, nahmen in 240 s ca. 0,1 nmol mg^{-1} Glycerol auf. Sowohl Wildtyp-EcFocA als auch die drei untersuchten Varianten EcFocA-F75A, -F75A/F202A und -F75A/F202A/L79A/L89A zeigten keine Aufnahme über dem Niveau des Hintergrunds (Abbildung 3-46).

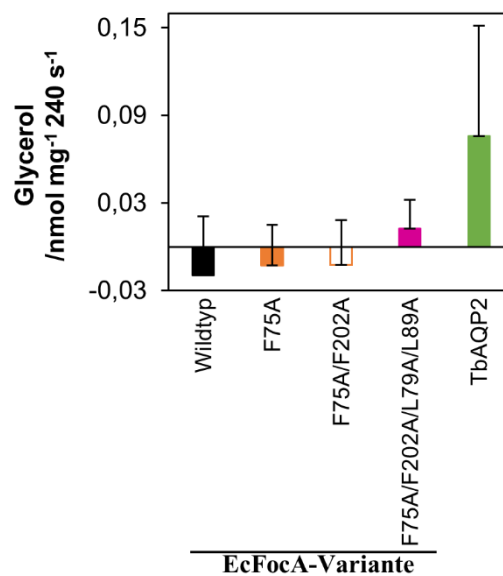


Abbildung 3-46: Glycerol-Aufnahme nach 240 s bei pH 6,8 durch die EcFocA-Varianten F75A (orange, geschlossen), F75A/F202A (orange, geöffnet), F75A/F202A/L79A/L89A (pink) im Vergleich zum EcFocA-Wildtyp N = 2, Fehler stellen S.E.M dar, und TbAQP2 N = 1, Fehler stellt hier die S.D. dar. Das Hintergrundsignal wurde abgezogen.

4 | Diskussion

Die Rolle der hochkonservierten, hydrophoben Konstriktionen innerhalb der FNT-Familie war vor dem Verfassen dieser Arbeit in der Literatur nicht abschließend geklärt. Es finden sich widersprüchliche Hypothesen und Ergebnisse, die ratenbestimmende (Wang *et al.*, 2009) oder richtungsweisende Funktionen (Hunger *et al.*, 2014), Selektivitätsfiltereigenschaften (Wang *et al.*, 2009) oder Wasserbarrieren postulieren (Czyzewski und Wang, 2012; 1.2.2.5). Auch über den Transportmechanismus und die Form des schwach sauren Substrates (protoniert oder deprotoniert) herrschte Uneinigkeit (1.2.2). Die strukturelle Ähnlichkeit zu den AQP ließ nur wenige Schlüsse zur Klärung dieser Fragen zu (1.2.1.1). Am prominentesten aber ist der Disput um das in nahezu allen FNT zu findende zentrale Histidin zwischen diesen Konstriktionen, dessen Protonierungszustand diskutiert wird.

4.1 Evaluation des Hefe-Testsystems

Zur Charakterisierung der hydrophoben Konstriktionen der FNT wurde der prokaryotische Prototyp, das EcFocA, sowie ein eukaryotischer Vertreter der Familie, das PfFNT, durch Modulation ihrer Konstriktionen untersucht. Die entsprechenden Gensequenzen konnten gezielt mutiert und erfolgreich in Hefezellen eingebracht werden (3.1). Western-Blot-Analysen bestätigten die erfolgreiche Expression nahezu aller generierten Varianten und der im Verlauf verwendeten Kontrollen in der für Substratpassageestudien verwendeten Hefelinie W3031A Δ jen1 Δ ady2 (3.1). Hierbei zeigten sich neben der Bande für das intakte Protomer auch kürzere Abbruchfragmente, vor allem für das EcFocA (Abbildung 3-1). Dies war für die Proteine bekannt und es war bereits beschrieben, dass die Funktion dadurch nicht gestört ist (EcFocA: Wiechert, 2017; hAQP9: Bader und Beitz, 2020; hMCT1: Köpnick *et al.*, 2021). So konnten die generierten Varianten der FNT in der Hefe auf Basis der erfolgreichen Expression charakterisiert werden.

S. cerevisiae-Hefe stellt ein äußerst robustes, zellbasiertes Expressionssystem dar, das über die untersuchte pH- und Temperaturspanne stabil ist (Volkov, 2015). Durch den *knock-out* der endogenen Monocarboxylattransporter Jen1 und Ady2 konnten sehr geringe Hintergrundeffekte erzielt werden (Wiechert, 2017). Dies wurde durch Aufnahmekurven im Neutralen bestätigt (Abbildung 3-4). Die korrekte Insertion von Mutanten, welche nur das Innere eines Membranproteins verändert

in die Hefe-Zellmembran vorwies, wurde bereits gezeigt (Wu *et al.*, 2015; Köpnick *et al.*, 2021). Außerdem ist der Radio-Assay für den diese Hefen eingesetzt wurden für die Bestimmung von kinetischen Parametern von Monocarboxylattransportern ausgelegt (Grollman *et al.*, 2000) und wurde im Arbeitskreis seit 2015 für das Hefe-Expressionssystem optimiert (Wu *et al.*, 2015). Das Anwendungsspektrum des Assays wurde durch Anwendung in einem 96-*well*-Platten-Format (2.14.2) und Efflux-Experimenten (2.14.1) erweitert und optimiert. Durch die Übertragung auf das 96-*well*-Format wurde die Messmethodik so auch für *screenings* zu FNT- und MCT-Inhibitoren optimiert (Meier, 2020) und die Erhebung der Daten wesentlich verkürzt wodurch der Durchsatz erhöht wurde. Gleichzeitig wurde das Abfallvolumen im Vergleich zum vor Beginn dieser Arbeit etablierten Assay im Sinne des Strahlenschutzes deutlich verringert (2.14.2). Durch Verwendung dieses Assays konnten so reine Effekte der Messbedingungen auf das FNT allein untersucht werden. Zusätzlich ist die Vermessung des eukaryotischen PfFNT in bakteriellen Systemen wie *E. coli* nicht möglich, da sich Proteinaggregate (bekannt als *inclusion bodies*) bilden (Holm-Bertelsen, 2016). Außerdem sind Hefen über einen großen pH-Bereich stabil und konnten so über die gesamte untersuchte pH-Spanne verwendet werden. Deshalb und zur Vergleichbarkeit des erhobenen Datensatzes mit in der Literatur publizierten Ergebnissen wurde auf die homologe Expression von EcFocA in *E. coli* verzichtet.

Studien an FNT zeigten bereits, dass jeder Subtyp ein präferiertes Substrat hat, welches deutlich höhere Aufnahmekapazitäten zeigt als Nebensubstrate (Tabelle 1; Rycovska *et al.*, 2012, Lü *et al.*, 2012b, Czyzewski und Wang, 2012, Wiechert *et al.*, 2017). Deshalb wurde für Experimente mit EcFocA-Varianten nur Formiat als endogenes Substrat gewählt und für PfFNT-Varianten meist L-Laktat, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu optimieren. Zur Vergleichbarkeit von Daten zum PfFNT mit EcFocA wurde jedoch teilweise auch die Formiat-Passage durch PfFNT gemessen.

4.2 Die FNT-Konstriktionen haben eine ratendiskriminierende Funktion

Die Ergebnisse zur endogenen Substratpassage durch diverse EcFocA- und PfFNT-Mutanten mit erweiterten Konstriktionen (3.1) bestätigen das widersprüchliche Bild in der Literatur, dass Erweiterungen der Konstriktionen

Diskussion

Die Richtung der Substratpassage durch FNT ist nicht durch die Konstriktionen bedingt

teilweise zu erhöhten, in anderen Studien zu gesenkten Aufnahme- oder -kapazitäten führten (Wang *et al.*, 2009; Czyzewski und Wang, 2012; Lyu *et al.*, 2021; 1.2.2.5). Diese Beobachtung wurde sowohl bei Einfach- und Doppelmutation für die exo- als auch für die zytoplasmatische Konstriktion gemacht (3.1.1, 3.1.2). Bei Erweiterung beider Konstriktionen kam die Substratpassage schließlich gänzlich zum Erliegen (3.1.3). Solche Kreuz-Mutanten sind in der Literatur noch nicht beschrieben und die Beobachtung, dass durch extreme Erweiterung der Konstriktionen der Transport komplett erliegt, ist neu.

Dies betont zunächst die essenzielle Funktion der Konstriktionen und ihrer Zusammensetzung, welche sich anhand des Konservierungsgrades bereits vermuten ließ (Mukherjee *et al.*, 2017; Abbildung 1-9). Es zeigt zudem die feine Abstimmung des Konstriktionsdurchmessers für die endogen optimale Substratpassage auf: Eine zu enge Pore würde Substrate der Größe wegen ausschließen (Wiechert *et al.*, 2017), aber eine sehr weite Pore scheint die Raten durch das Protein nicht unermesslich zu steigern, sondern ab einem gewissen Durchmesser zu verlangsamen. Anhand mehrerer Mutanten von zwei verschiedenen FNT wurde so experimentell die ratendiskriminierende Funktion der hydrophoben Konstriktionen der FNT gezeigt.

4.3 Die Richtung der Substratpassage durch FNT ist nicht durch die Konstriktionen bedingt

Neuere Literatur zum EcFocA postuliert zwei verschiedene Substratpassage-mechanismen für Influx und Efflux (Kammel *et al.*, 2022a; Kammel *et al.*, 2022b; 1.2.2.3). Einzelne konstriktionsbildende Aminosäuren seien demnach allein für den Export und andere allein für den Import zuständig (Hunger *et al.*, 2014). Der *dielectric-slide*-Mechanismus wurde allein durch Substratimport-Experimente aufgestellt und aufgrund der pseudo-symmetrischen Struktur der FNT (Abbildung 1-5) die Übertragbarkeit für den Export zwar angenommen, aber nicht experimentell überprüft (Wiechert, 2017). Der *proton-relay*-Mechanismus wurde durch Metaanalysen aufgestellt und soll bidirektional gleich ablaufen (Lü *et al.*, 2013). Für bakterielle FNT sind beide Passage-Richtungen gleichbedeutend, da je nach physiologischem Zustand und Umgebung die Substrate aufgenommen oder abgegeben werden (Suppman und Sawers, 1994). Für einige FNT, wie dem

Diskussion

Die Richtung der Substratpassage durch FNT ist nicht durch die Konstriktionen bedingt

eukaryotischen PpFNT, ist hingegen allein die Efflux-Passage physiologisch relevant, da sie allein zum Ausschleusen von Stoffwechselendprodukten verwendet werden (Wu *et al.*, 2015).

Um den Einfluss der Konstriktionen auf die Direktionalität der FNT zu untersuchen, wurden die generierten EcFocA-Varianten mit einfach modulierter Konstriktion neben dem Influx- auch auf Änderungen im Efflux-Verhalten hin untersucht (3.1.4). Hierbei wurde bestätigt, dass die FNT bidirektional leiten, und gezeigt, dass unabhängig von der Lage der eingebrachten Mutation ähnliche Auswirkungen auf den Substratexport, analog dem Influx, resultierten. Da die eingesetzten Hefen für Efflux-Kurven aufgrund unterschiedlicher Raten in Influx-Richtung (3.1.1, 3.1.2) eine unterschiedliche Beladung zum Start der Efflux-Messung aufwiesen, musste für einen Vergleich untereinander das Messsignal für Efflux-Kurven auf den jeweiligen Startpunkt normiert werden. Dadurch ist ein direkter Vergleich mit Zahlenwerten der Influx-Experimente nicht möglich. Es ist dennoch abzuleiten, dass die Konstriktionen für beide Richtungen der Substratpassage essenziell sind, da die einfache Erweiterung bereits zu Änderungen des endogenen Transportverhaltens in beide Richtungen führte. Dies spricht gegen unterschiedliche Transportmechanismen je Transportrichtung (Kammel *et al.*, 2022a; Kammel *et al.*, 2022b, 1.2.2.3).

Kontrollen mit einem milchsäureleitenden Kanalprotein (hAQP9), einem Monocarboxylat/H⁺-leitenden Transporter (hMCT1) und dem Wildtyp-EcFocA (Abbildung 3-12) zeigten außerdem, dass das gewählte und optimierte Messsystem in der Lage war, die Unterschiede zwischen den Proteintypen darzustellen: Der klassische Transporter hMCT1 zeigte verglichen zum EcFocA-Wildtyp einen langsameren Ausstrom aus den Hefezellen. Der klassische Kanal hAQP9 hingegen zeigte keinen Efflux, da es die Substratprotonierung nicht erleichtert und zytosolisch (neutraler pH) kaum das neutralisierte Substrat Milchsäure vorliegt. Dies zeigte so die Akkumulation von L-Laktat über das hAQP9 in den Hefezellen nach dem Prinzip einer Ionenfalle an. Dieser Ionenfallen-Mechanismus über hAQP9 wurde von Katharina Geistlinger erstmalig beobachtet und wurde durch die in dieser Arbeit getätigten Efflux-Experimente bestätigt (Geistlinger *et al.*, 2022). Es zeigte sich durch diese Vergleiche, dass die Substratprotonierung vom Wildtyp-EcFocA auch in Efflux-Richtung erleichtert ist, da sonst kein Efflux zu beobachten wäre.

Diskussion

Die Richtung der Substratpassage durch FNT ist nicht durch die Konstriktionen bedingt

In den zitierten homologen *in-vivo*-Studien am EcFocA ist zwar der *knock-out* des *focA*-Gens im *E. coli*-Genom gegeben (Hunger *et al.*, 2014), jedoch sind andere Effekte nicht direkt berücksichtigt. Es ist beispielsweise bekannt, dass Formiat die Bakterien auch über einen bisher unbekanntem Weg verlassen kann, etwa über ein weiteres FNT, wie das EcNirC, oder auch über noch nicht identifizierte Proteine (Beyer *et al.*, 2013). Zudem ist auch die feine Abstimmung der Expression der Pyruvat-Formiat-Lyase B (PflB) und dem EcFocA *in-vivo* beschrieben (Sawers, 2006). Außerdem sind mehrere Gene in *E. coli* durch die Formiat-Hydrogen-Lyase A (FhIA) reguliert, welche durch Formiat stimuliert wird (Beyer *et al.*, 2013). So sind im homologen Testsystem sicher die Bedingungen näher an den endogenen und bilden die ganze Funktion des Formiat-Stoffwechsels in *E. coli* ab. Um jedoch eindeutige Schlüsse, allein über das EcFocA und damit im Allgemeinen über FNT zu treffen, mag ein isoliertes Testsystem besser geeignet sein.

Auch die in einigen Studien zu den FNT verwendeten Proteoliposomen decken diese Eigenschaften ab. Hier gestaltet sich jedoch die Extraktion aus einem zell- oder zellfrei-basierten Expressionssystem als limitierender Schritt und viele der Messungen sind etwa aufgrund der Stabilität oder Größe der Proteoliposomen nur bedingt in solchem Umfang möglich, wie die in dieser Arbeit getätigten Experimente in der Hefe (Holm-Bertelsen *et al.*, 2016). Daten zur Funktionalität des PflFNT bestätigten bereits die Vergleichbarkeit von hefe- und zellfreibasierten Studien über FNT und unterstützen so die Nutzung des heterologen Expressionssystems (Hajek *et al.*, 2019).

So sind die neuesten Hypothesen zum EcFocA aus *in-vivo*-Studien im Kontext des Gesamtproteoms und dessen genetischer Regulation in *E. coli*-Bakterien zu betrachten, wohingegen die in dieser Arbeit und die meisten der sonst zu FNT veröffentlichten Studien, allein auf die FNT zu beziehen sind. So kann mit den Daten zum FNT-Efflux aus dieser Arbeit (3.1.4) vermutlich ausgeschlossen werden, dass ein FNT allein zwei verschiedene Transportmechanismen aufweist. Ein *gating* durch ein intrazellulär bindendes Protein (wie vom PflB am EcFocA) hingegen könnte tatsächlich ein FNT beeinflussen und *in-vivo* einen Einfluss auf die Richtung der Substratpassage haben. Dies könnte die Diskrepanzen in der Literatur (Lü *et al.*, 2013; Wiechert und Beitz 2017b; Helmstetter *et al.*, 2019; Kammel *et al.*, 2022a; Kammel *et al.*, 2022b; 1.2.2.3) erklären.

4.4 Die pH-abhängige Substratpassage durch FNT ist nur mit hydrophoben Konstriktionen möglich

Für FNT war bekannt, dass sie im neutralen noch einen leichten Anionenstrom aufweisen, aber im Säuren durch Nutzen der PMF reine Anion/H⁺-Symporter sind (Wu *et al.*, 2015; Wiechert und Beitz 2017b). Deshalb wurde die pH-Abhängigkeit der Substratpassage der generierten FNT-Varianten über eine pH-Spanne von vier Einheiten mit dem Wildtyp-Verhalten verglichen (3.2). Für die beiden Wildtyp-FNT zeigte sich der bekannte glockenförmige, pH-abhängige Kurvenverlauf (Abbildung 3-15; Wiechert und Beitz, 2017b). Der Anstieg ergibt sich durch die ansteigende Protonenkonzentration im Säuren, der Abfall ist damit zu erklären, dass ab ca. pH = pK_s weniger anionisches Substrat vorliegt, und damit die Substratattraktion verringert ist (Lü *et al.*, 2011; Wiechert und Beitz, 2017b). Es bestätigte sich auch, dass das PfFNT weniger und langsamer Formiat leitet als das EcFocA. Dies ist durch die Größe des vorgelagerten Φ /K-Filters zu erklären, der für jedes FNT an das endogene Hauptsubstrat angepasst ist (Wiechert *et al.*, 2017).

Die untersuchten EcFocA-Varianten decken eine Vergrößerung der exoplasmatischen Konstriktion um das 12- bis 36-fache ab (Abbildung 3-17). Für alle Mutanten, außer die EcFocA-Variante mit der kleinsten Erweiterung (EcFocA-F75N), zeigte sich eine Entkopplung der initialen Transportrate vom pH-Wert des externen Mediums und nur schwache, konstante initiale Transportraten oder der vollständige Verlust der Formiatpassage im Säuren (3.2, Abbildung 3-18). So wurde der Unterschied zwischen Mutanten und Wildtyp im Säuren immer größer. Für das modulierte eukaryotische PfFNT zeigte sich derselbe Sachverhalt. Dies unterstreicht damit den Modellcharakter vom EcFocA und zeigt die allgemeine Übertragbarkeit der Ergebnisse dieser Arbeit auf andere Vertreter der FNT-Familie, besonders für den Subtyp der Formiat-Kanäle (Tabelle 1).

FNT erleichtern endogen die Protonierung des Substrates (Bader und Beitz, 2020; 4.3). Dies wird besonders deutlich, betrachtet man das Protonierungsgleichgewicht des Substrates eines Kanal- oder Transportproteins parallel zum Anstieg der initialen Transportrate für dieses (Abbildung 4-1). Für das EcFocA zeigt sich hierbei, dass die gefittete Glockenkurve, die den Verlauf der gemessenen initialen Transportrate abbildet, deutlich über dem

Diskussion

Die pH-abhängige Substratpassage durch FNT ist nur mit hydrophoben Konstriktionen möglich

Protonierungsgleichgewicht der Ameisensäure verläuft (Abbildung 4-1). Daraus kann gefolgert werden, dass EcFocA die Protonierung des Substrates erleichtert, da es das zeitweise neutrale Substrat leitet und so das Proton mit durch die Pore führt. Für ein Protein, welches allein die bereits protonierte Säure leitet, liegt die Kurve, die die initiale Transportrate abbildet, auf der Protonierungskurve der Säure (Rothert *et al.*, 2017).

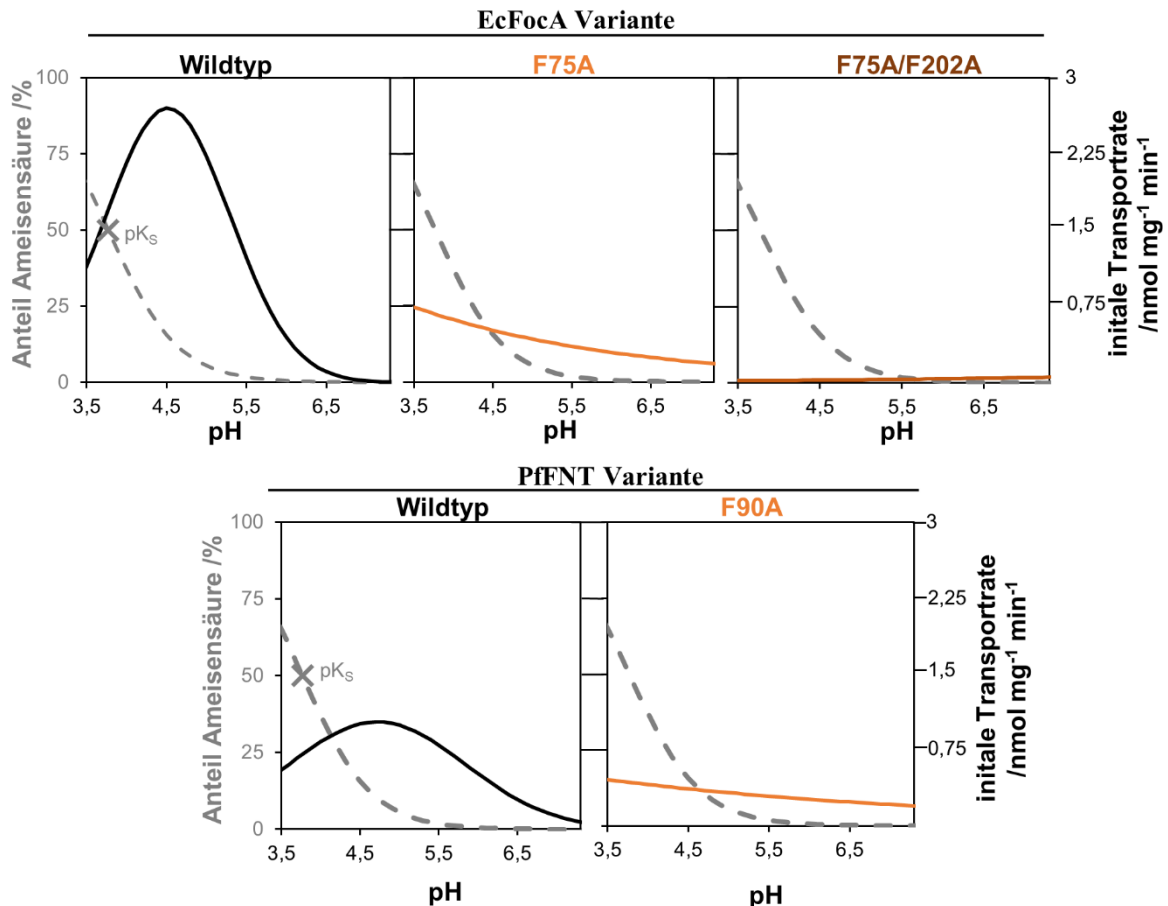


Abbildung 4-1: Vergleich von initialer Transportrate von Formiat durch FNT-Varianten und dem frei in Lösung vorliegenden Anteil Ameisensäure (grau gestrichelt). Die maximal gemessene initiale Transportrate ($3 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) wurde hier einem Ameisensäure-Anteil von 100 % gleichgesetzt.

Betrachtet man analoge Diagramme exemplarisch für drei in dieser Arbeit getesteten Alanin-Mutanten der exoplasmatischen Konstriktion (EcFocA-F75A und -F75A/F202A; PfFNT-F90A), zeigt sich, dass der Verlauf der initialen Transportrate nicht konstant über der Protonierungskurve verläuft. Die EcFocA-F75A-Mutante liegt ab ca. pH 4,5 darunter, für die Doppelmutante EcFocA-F75A/F202A bereits ab einem pH von 5,5. Dies entspricht in diesem Fall dem pH-Wert, ab dem sich der Transport gänzlich einstellte (Abbildung 4-1).

Ein solch schwacher Anstieg der pH-abhängigen initialen Transportrate ist bereits für die EcFocA-K156C-Mutante bekannt, bei welcher ein Verlust der

Diskussion

Die pH-abhängige Substratpassage durch FNT ist nur mit hydrophoben Konstriktionen möglich

Substratattraktion bekannt war (Wiechert und Beitz, 2017b). Dies bestätigt: Wenn die Substratpassage nicht durch das FNT erleichtert wird, steigt die initiale Transportrate nur schwach im Vergleich zum Wildtyp an. Im Falle der K156C-Mutante war die Substratattraktion ausgeschaltet und resultierte im beschriebenen Kurvenverlauf. Da das für die Substratattraktion notwendige Histidin (*proton relay*) bzw. Lysin (*dielectric slide*) unverändert in den genannten Mutanten war, kann hier nur der Effekt der erleichterten Substratprotonierung der zur Substratpassage notwendig ist zu tragen kommen. Diese war in den generierten Mutanten demnach nicht mehr erleichtert.

Dieses zum Wildtyp abweichende Verhalten im Sauern (ab $\text{pH} < 6,3$) für die genannten konstriktionserweiterten FNT-Varianten schreibt den Konstriktionen damit eine funktionelle Rolle im Transportmechanismus zu. Nur mit intakten, engen Konstriktionen ist die endogene Funktionsweise des FNTs vollständig gegeben: Ist die Pore weiter, steigt zwar ggf. im Neutralen die initiale Transportrate (EcFocA-F75A), aber kann im Sauern nicht mehr exponentiell erhöht werden.

Der saurere pH-Bereich, bei dem gemessen wurde, scheint zunächst physiologisch nicht relevant. Jedoch kann das Zytosol oder der peri- bzw. exoplasmatische Raum bei erhöhter Laktat-/Formiat-/Acetat-Produktion oder -Assimilierung partiell deutlich unter dem physiologischen pH liegen (Putnam, 2012). Genau dann kommt dieser FNT-Mechanismus mit erhöhten Raten im Sauern, zu tragen. Durch die Attraktion des Substrates zur Pore, wird, wie bei milchsäureleitenden AQP, lokal der pH gesenkt und damit die Rate zur schnelleren Passage gesteigert (Rothert *et al.*, 2017).

Da das unterschiedliche Verhalten der konstriktionserweiterten EcFocA- und PfFNT-Mutanten verstärkt im Sauern beobachtet wurde, verknüpft es das veränderte Transportverhalten so zwangsläufig mit einem Protonierungsvorgang, da außer der erhöhten Protonenkonzentration keinerlei Änderungen im Messsystem vorgenommen wurden. Die einzige Protonierungsstelle die innerhalb des Proteins durch die Konstriktionserweiterung freigelegt wird, ist das zentrale Histidin, da sonst innerhalb der FNT-Pore keine protonierbaren Aminosäuren liegen (Abbildung 1-6).

Obwohl durch die durchgeführten Substitutionen von Phenylalanin und Leucin gegen Alanin und Valin die Hydrophobizität innerhalb der Konstriktionen erhalten

Diskussion

Die Eröffnung der FNT-Konstriktionen führt zur Protonierung des zentralen Histidins

blieb, wurden sie durch diese Mutationen so weit, dass Wasser ausreichend Platz hätte, in den Transportpfad einzudringen (Abbildung 4-2). Kristallstrukturen des CdHSC zeigen ebenfalls, dass mit einer solchen Mutation die Pore weit genug für Wasser wird (Abbildung 1-13; Czyzewski und Wang, 2012). Es konnte zudem bereits durch MD-Simulationen gezeigt werden, dass während der Substratpassage nur eine Konstriktion zurzeit durch *flickering* geöffnet vorliegt und sich nie eine durchgehend geöffnete Pore ausbildet (Mukherjee *et al.*, 2020). Dies wäre durch so modulierte Konstriktionen nicht mehr möglich, und könnte eine dauerhaft für neue Substrate wie Wasser geöffnete Pore darstellen.

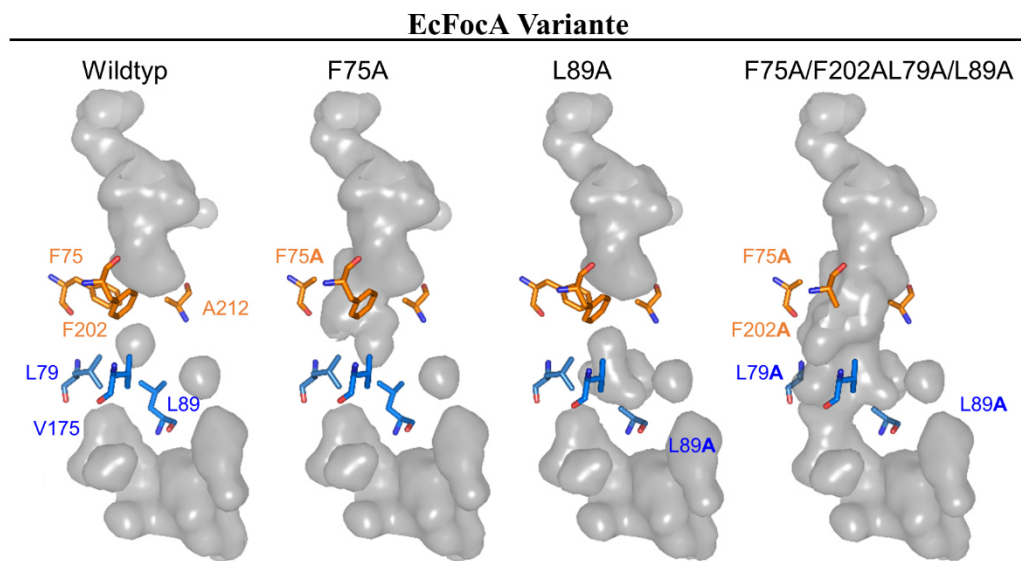


Abbildung 4-2: Seitenansicht konstruktionserweiterter EcFocA-Varianten. Grau: lösungsmittelzugänglicher Raum, orange: exoplasmatische Konstriktion, blau: zytoplasmatische Konstriktion. Es ist zu erkennen, dass der lösungsmittelzugängliche Raum durch die Alanin-Substitutionen erweitert wird.

Basierend auf diesen ersten Ergebnissen wurden drei Hypothesen aufgestellt, die eine Erklärung für das beobachtete Verhalten bieten:

1. Durch die Eröffnung der Konstriktionen kann Wasser in den Transportpfad eindringen.
2. Das eindringende Wasser kann das zentrale Histidin protonieren.
3. Durch das Eindringen des Wassers sind Substratmoleküle nicht vollständig von der Hydrathülle befreit und deren Protonierung wird erschwert.

4.5 Die Eröffnung der FNT-Konstriktionen führt zur Protonierung des zentralen Histidins

Um die Hypothese, die ein etwaig protoniertes Histidin vermutet, zu prüfen, wurden Substrataffinitäten und Arrhenius-Aktivierungsenergien von bereits

beschriebenen FNT-Varianten gemessen und mit *in-silico*-Vorhersagen verglichen.

4.5.1 Die Substrataffinität der FNT ändert sich nicht mit eröffneter Konstriktion

Bei einem kationischen, protonierten Histidin war eine Erhöhung der Affinität des anionischen Substrates zum FNT zu erwarten. Michaelis-Menten-Kinetiken bestätigten diese Hypothese jedoch nicht (3.4). Unter neutralen pH-Bedingungen wiesen EcFocA-Wildtyp und F75A-Mutante beide kanaltypisch niedrige Substrataffinitäten und schnelle maximale Raten auf (Conde *et al.*, 2010, Abbildung 3-20) die sich gut in die Literatur fügen (Tabelle 9). Die niedrigen Substrataffinitäten bzw. hohen K_M -Werte sind eines der Hauptmerkmale, die die Zuordnung der FNT zu den klassischen Transportern oder Kanälen erschweren (1.2). Aufgrund der enzymähnlich proteinvermittelten Erleichterung der Substratprotonierung ist inzwischen jedoch die Klassifizierung als sekundär aktive Transporter vorgeschlagen und begründet (Bader und Beitz, 2020). Lediglich für das StFocA und Formiat findet sich eine deutlich höhere Substrataffinität (Tabelle 9). In dieser Quelle ist jedoch der pH der Messung nicht nachvollziehbar, der einen großen Einfluss auf die Substrataffinität hat. Denn im Säuren zeigte sich, dass für beide untersuchten EcFocA-Varianten der K_M -Wert sank und damit die Substrataffinität stieg, jedoch im selben Ausmaß (3.4.2). Die maximale Geschwindigkeit der F75A-Mutante hingegen war deutlich niedriger als die des EcFocA-Wildtyps (Abbildung 3-21). So wurde erneut deutlich, dass Ansäuern ein FNT mit eröffneten Konstriktionen inhibiert und dass die erhöhte Protonenkonzentration vom modulierten FNT nicht mehr toleriert werden kann. Dies spricht für ein Protonierungsevent. Es bestätigt, dass die (intakten) Konstriktionen maßgeblich daran beteiligt sind, die Substratpassage auch bei erniedrigtem pH zu gewährleisten (4.4). Auch, dass die Affinität zum Substrat im Säuren steigt, fügt sich in die Literatur ein (Tabelle 9).

Diskussion

Die Eröffnung der FNT-Konstriktionen führt zur Protonierung des zentralen Histidins

Tabelle 9: Übersicht über die in der Literatur bestimmten Substrataffinitäten (K_M -Werte) zu verschiedenen pH-Werten für FNT.

FNT	K_M /mM	Substrat	pH	Referenz
EcFocA	81 ± 22	Formiat	6,8	diese Arbeit
	16 ± 2		5,8	
EcFocA-F75A	158 ± 44	Formiat	6,8	diese Arbeit
	16 ± 6		5,8	
EcFocA	119 ± 32	Formiat	6,8	Wiechert und Beitz 2017b
EcFocA-E208Q	51 ± 20			
StFocA	96 ± 14	L-Laktat	5,8-7,4	Lü <i>et al.</i> , 2012a
	24 ± 2	Acetat		
	11,7 ± 0,1	Formiat		
PfFNT	87	L-Laktat	6,8	Wu <i>et al.</i> , 2015
	17		4,8	
EhFNT	> 200	Acetat	6,8	Helmstetter <i>et al.</i> , 2017
StNirC	2,9	Nitrit	7,0	Rycovska <i>et al.</i> , 2012
	12	Nitrat		

Für das StNirC hingegen sind unabhängig von einem pH zwischen 5 und 8 deutlich niedrigere K_M -Werte und damit höhere Substrataffinitäten beschreiben (Tabelle 9). Diese Unterschiede zwischen FocA- und NirC-Vertretern der FNT-Familie (Tabelle 1, 1.2) sind durchaus plausibel. EcNirC zeigte im Messsystem, welches auch in dieser Arbeit verwendet wurde, deutlich langsamere initiale Transportraten für Formiat als das EcFocA und PfFNT, was auf höhere Affinitäten spekulieren lässt (Wiechert *et al.*, 2017). So sind die Ergebnisse dieser Arbeit mit der Literatur vereinbar und verknüpfen nun die Erweiterung der Konstriktionen mit der maximalen Transportrate. Erhöhte Substrataffinitäten, die eine vermutete Bindung zwischen anionischem Substrat und protoniertem Histidin anzeigen würden, konnten jedoch nicht observiert werden.

4.5.2 Die Aktivierungsenergie der FNT steigt durch Konstriktionserweiterung

Ein protoniertes Histidin könnte eine Energiebarriere für das anionische Substrat darstellen. So sollten sich mit eröffneten Konstriktionen die Aktivierungsenergien erhöhen (3.4). Bestimmungen der Aktivierungsenergien zeigten für das EcFocA mit der Literatur kongruente ebenfalls kanaltypische niedrige Aktivierungsenergien (Liu *et al.*, 1996; Conde *et al.*, 2010; 4.5.1). Für die alanin- und valinsubstituierten Varianten lag die E_a deutlich höher und zeigte somit tatsächlich, dass eine Energiebarriere für das Substrat durch Eröffnung einer

Diskussion

Die Eröffnung der FNT-Konstriktionen führt zur Protonierung des zentralen Histidins

Konstriktion geschaffen wurde (Abbildung 3-23). Dies könnte ein potenziell protoniertes Histidin anzeigen. Es lässt sich ableiten: Je weiter die Pore ist, desto höher ist vermutlich der Anteil protonierten Histidins und desto größer ist die Hemmung der Substratpassage. Dies erklärt auch den Verlust der Formiatpassage-Fähigkeit von Doppel- und Kreuz-Mutanten.

Die abgeleitete E_a für das PffNT lag deutlich höher als ein in der Literatur bekannter Wert ($1,5 \text{ kcal mol}^{-1}$; Wiechert und Beitz, 2017b), aber immer noch im niedrigen kanalproteintypischen Bereich. Die PffNT-F90A-Variante zeigte im Neutralen keine Erhöhung der E_a im Vergleich zum Wildtyp und im Unterscheid zum EcFocA-Analogon. Vergleicht man die gemessene Aktivierungsenergie der PffNT-F90A-Variante mit dem Literaturwert der Aktivierungsenergie für das PffNT liegt sie jedoch deutlich darüber und im Einklang mit den Daten, die sich aus Experimenten am EcFocA ergaben. Die Messung am PffNT wurde für die Vergleichbarkeit mit dem Literaturwert mit Formiat durchgeführt. Es wurde jedoch bereits diskutiert, dass das PffNT für Formiat nur eine niedrigere Rate zeigt (4.1) und somit der Unterscheid zum Hintergrund geringer ausfällt als bei der Verwendung von L-Laktat. Für aussagekräftigere Daten zum PffNT sollte die Messung deshalb mit L-Laktat wiederholt werden. Zudem war die Messung durch die nur schwache Temperaturabhängigkeit und damit nur sehr geringen Steigungen des Raten-Temperatur-Plots der untersuchten FNT mit großen Fehlern behaftet (Abbildung 3-25).

Im Säuren sollte der Anteil von protoniertem Histidin steigen (1.1). Messungen der Aktivierungsenergien im Säuren zeigten, dass sich die Aktivierungsenergien von EcFocA-Wildtyp und F75A-Mutante im Vergleich zum pH 6,8 annähern (3.4.2). So scheint sich der EcFocA-Wildtyp im Säuren mit erhöhter E_a eher transportertypisch zu verhalten und die F75A-Variante immer kanalähnlicher zu werden. Zwar wurde die Messung bei pH 4,8 nur einmalig durchgeführt und sollte mit biologischen Replikaten wiederholt werden, nichtsdestotrotz ist ein Trend abzulesen. Es verfestigte sich damit weiter die Beobachtung, dass mit erweiterter Konstriktion die endogene Funktion des FNT nicht mehr gegeben ist und sich dieser Effekt bei Erhöhung der Protonenkonzentration verstärkt.

Zur Erklärung der Annäherung der Aktivierungsenergien können die gemessenen Substrataffinitäten herangezogen werden (4.5.1). Eine höhere Affinität stellt eine größere Energiebarriere für das Substrat dar. Dies schien

Diskussion

Die Eröffnung der FNT-Konstriktionen führt zur Protonierung des zentralen Histidins

zunächst widersprüchlich, da sich die initialen Transportraten im Säuren erhöhten und so keine erhöhte Energiebarriere erwartet wurde. Niedrige Affinitäten sind mit schnellen Raten verknüpft, dies scheint im FNT aber umgangen zu werden. Denn die Erhöhung der Substrataffinität (um Faktor 6) ist nicht so deutlich wie die Erhöhung des Protonengradienten (um Faktor 100), der die Substratpassage treibt. So kann ein Anstieg der Transportrate (um Faktor 35) trotz erhöhter Substrataffinitäten im Säuren erklärt werden. Da dies von der Mutante nicht erbracht wurde, stützt dies die These eines protonierten zentralen Histidins.

Die Aktivierungsenergie beschreibt die Temperaturabhängigkeit der Substratpassage. Temperaturabhängig ist bei der FNT-Substratpassage vor allem die Bewegung der Seitenketten der Konstriktionen, da sie aufschwingen müssen, damit Substrat passieren kann (*flickering*). Je größer und voluminöser die sich bewegenden Reste sind, desto höher ist demnach auch die aufzubringende Energie (Wambo *et al.*, 2017). Sind die Reste kleiner, ist weniger Bewegungsenergie nötig und desto größer sind die Raten bei warmen Temperaturen. Dies resultiert in einer erhöhten Temperaturabhängigkeit. So beschreibt die erhöhte Aktivierungsenergie auch den Effekt, der vermindert notwendigen Seitenkettenbewegung (*flickering*) nach Konstriktionserweiterung und kann erhöhte Aktivierungsenergien der Mutanten erklären. Ein ähnlicher Effekt ist für AQP mit unterschiedlich großen Selektivitätsfiltern beschrieben (Wambo *et al.*, 2017). Dies gilt selbstverständlich nur über einen vom Protein tolerierten Temperaturbereich, der nicht zur Denaturierung führt in dem die Diffusionsgeschwindigkeit nicht maßgeblich beeinträchtigt ist. Deshalb wurde nur zwischen 4 °C und 19 °C gemessen.

4.5.3 *In-silico*-Modellierungen bestätigen ein protoniertes Histidin bei eröffneter Konstriktion

Die Ergebnisse der pH-abhängigen Substratpassage, der maximalen Transportrate und der Aktivierungsenergie stützen die aufgestellte Hypothese des durch Konstriktionserweiterung eröffneten Histidins. Genau wie für die Substrate kann für den Anteil der protonierten Histidinreste der pK_s-Wert des Imidazolrings der Seitenkette herangezogen werden. Dieser beträgt in Wasser 6,5 (Williams, 2022). Damit wäre unter den neutralen Messbedingungen bereits die Hälfte der zentralen Histidine der exprimierten FNT protoniert. Mit Aufklärung der StNirC-Struktur wurde jedoch vermutet, dass der pK_s-Wert des zentralen Histidins in der

Diskussion

Die Eröffnung der FNT-Konstruktionen führt zur Protonierung des zentralen Histidins

hydrophoben Pore niedriger ist, da eine Ladung hier nicht bevorzugt ist (Lü *et al.*, 2012). Dasselbe Prinzip liegt dem *dielectric-slide*-Mechanismus für die Verschiebung der Säurestärke zugrunde (siehe 1.2.2.2).

Modellierungen der Solvatisierung (2.18) von FNT-Varianten ergeben für das EcFocA, dass der pK_s des zentralen Histidins tatsächlich deutlich von den anderen lösungsmittelzugänglichen Histidinen im EcFocA abweicht (Abbildung 4-3). Dies widerspricht anderen *in-silico*-Studien am EcFocA, die einen pK_s -Wert von 8,25 postulieren (Feng *et al.*, 2012).

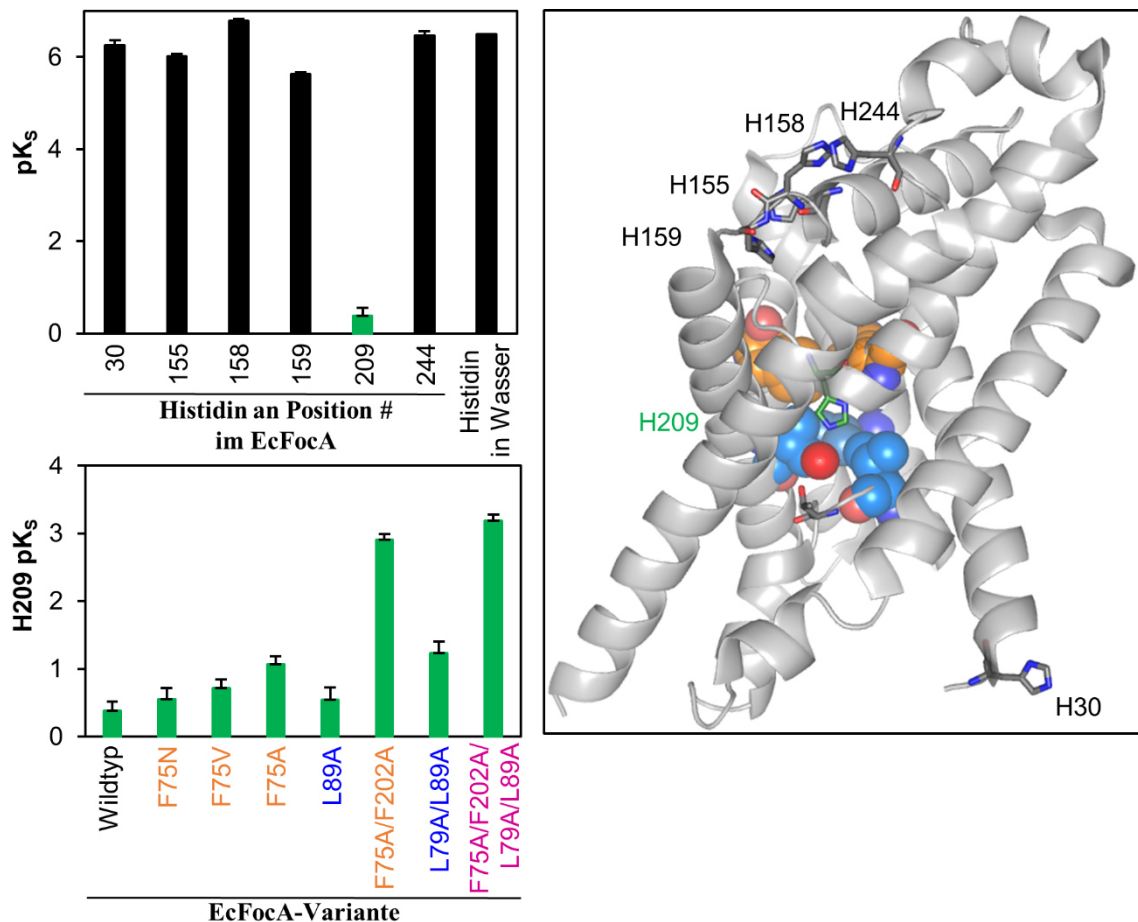


Abbildung 4-3: Oben links: Berechnung der pK_s -Werte der Histidine im EcFocA. Unten links: Berechnung der pK_s -Werte für das zentrale Histidin an Position 209 (grün) für verschiedenen EcFocA-Varianten. Fehler stellen die Schwankung über die fünf Protomere als S.E.M. dar. Rechts: Lage aller im FNT vorkommenden Histidine. Orange und blau: Konstruktionen als Sphären sowie das mit dem zentralen Histidin und Threonin (grau) koordinierte Wassermolekül (rote Kugel).

Für die modulierten EcFocA-Varianten ergeben die Berechnungen im Vergleich zum Wildtyp erniedrigte Säurestärken und damit erhöhte pK_s -Werte für das zentrale Histidin. Dies indiziert, wie durch die experimentellen Daten vermutet, je weiter die Pore ist, desto wahrscheinlicher ist die Protonierung des Histidins bzw. desto größer ist der Anteil von protoniertem Histidin (Abbildung 4-3).

Diskussion

Die Eröffnung der FNT-Konstriktionen führt zur Protonierung des zentralen Histidins

Dies stützt die These, dass mit Porenerweiterung das zentrale Histidin zu vermehrten Anteilen protoniert vorliegt. Analoge Resultate, dass eine eröffnete Pore den pK_s-Wert des zentralen Histidins in FNT erhöht, wurden bereits für das PfFNT mit gebundenem Inhibitor gezeigt (Seick, 2021). Die erfolgreiche Inhibition des PfFNTs führt zum Verlust der Laktatpassage-Fähigkeit und *in-vivo* zum Absterben der malariaerregenden Plasmodien (Golldack *et al.*, 2017; Walloch *et al.*, 2020; Walloch *et al.*, 2021). Der Inhibitor MMV007839 schiebt sich dazu von zytoplasmatischer Seite in eine FNT-Transportpore und verstopft sie so (Peng *et al.*, 2021). Dadurch werden die konstriktionsbildenden Phenylalanine in eine geöffnete Rotamer-Position gezwungen und dort fixiert. Damit erhöht sich der pK_s-Wert des zentralen Histidins im PfFNT um knapp eine Einheit (Seick, 2021). Erneut wird so die Übertragbarkeit der Ergebnisse von pro- auf eukaryotische FNT untermauert.

Jegliche Form der Mutation des Histidins führte im Rahmen dieser Arbeit (Abbildung 3-19) und in anderen Studien (Lü *et al.*, 2012b; Wiechert und Beitz, 2017b; Helmstetter *et al.*, 2019; Lyu *et al.*, 2021) zum Funktionsverlust der FNT. So könnte zunächst überlegt werden, dass das zentrale Histidin analog dem *proton-relay*-Mechanismus aktiv am Transport beteiligt ist. Da jedoch Messungen an natürlich vorkommenden FNT ohne zentrales Histidin ebenfalls eine pH-gekoppelte initiale Transportrate zeigten, obwohl kein protonierbarer Rest in der FNT-Pore zu finden ist, kann das zentrale Histidin nicht an der Neutralisierung des Substrates beteiligt sein (Helmstetter *et al.*, 2018). Die essenzielle Rolle des hoch-konservierten Histidins wurde als rein strukturell eingeordnet, da es durch die Wasserstoffbrückendonoreigenschaften nicht nur die Pore in ihrer Form fixieren kann, sondern auch ein neutrales Substrat stabilisiert (Atkovska und Hub, 2017).

Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen diese These (4.2, 4.3, 4.4) und widersprechen damit den erläuterten *in-vivo*-Studien am EcFocA, die ein protoniertes Histidin für den Substrat-Import postulieren (Kammel *et al.*, 2022a; Kammel *et al.*, 2022b). Aus den diskutierten Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Konstriktionen das zentrale Histidin vor einer Protonierung durch das Bulkwasser schützen (4.7.2). Das Einbringen eines positiv geladenen Arginins in die exoplasmatische EcFocA-Konstriktion führte bereits bei neutralem pH zu deutlich verminderten initialen Transportraten (Abbildung 3-6) und bekräftigt somit

ebenfalls die These, dass eine kationische Ladung innerhalb der FNT-Pore die Passage des endogenen Substrates hemmt.

FNT scheinen nach dem Prinzip des Ladungsausgleiches (*charge compensation*, Ruprecht *et al.*, 2019) genau eine positive Ladung aufzuweisen, um ein monovalent-anionisches Substrat anzuziehen. So ist durch die Substratattraktion netto keine Ladung mehr im Protein. Wäre das zentrale Histidin (zeitweise) protoniert, wäre mit dem Lysin im Vestibül ein Überschuss an positiver Ladung in der FNT-Pore. Es wäre denkbar, dass dann kleine bivalente Anionen dem FNT zugänglich sind, und die Selektivität für monovalente Anionen verloren geht. Denkbar wären Hydrogenphosphat oder Sulfat, wobei hier zu berücksichtigen ist, dass dies Anionen starker Säuren sind und damit trotz der Verschiebung der Säurestärke schwer zu protonieren wären.

4.6 Die Anionenselektivität der FNT ist durch die Konstriktionen gegeben

Die Hefen, die für die Experimente zur endogenen Substratpassage verwendet wurden, zeigten nach Transformation mit dem jeweiligen Konstrukt unterschiedliche Generationszeiten (Abbildung 3-2). Besonders die Kreuz-Mutanten, welche kein endogenes Substrat leiteten (3.1.3), zeigten deutlich verlangsamtes Wachstum (Abbildung 3-2). Hefen, die mit dem für die L89A/F202A-Kreuz-Mutante kodierenden Plasmiden transformiert waren, zeigten die mit Abstand höchste Generationszeit. Für diese Variante konnte in der verwendeten Hefe auch kein Expressionsnachweis geliefert werden (Abbildung 3-1). Dies kann korrelieren, da ein vermehrter Abbau eines etwa fehlgefalteten heterolog exprimierten Proteins viel Energie bedarf und dadurch das Wachstum verlangsamt ist (Amm *et al.*, 2014).

Die verlangsamten Generationszeiten von Hefen, bei denen die Expression des entsprechenden Konstruktes nachgewiesen wurde, legt die Vermutung nahe, dass durch die Porenerweiterung ein unspezifisches Leck im FNT für andere Solute entstanden sein könnte. Damit wären die Hefen etwa einem erhöhten osmotischen Stress oder einem Nährstoffmangel ausgesetzt, was das verlangsamte Wachstum erklären könnte (Wu *et al.*, 2009). Zudem wurde anhand der Ergebnisse zur Substratpassage bereits postuliert, dass Wasser mit in und gegebenenfalls durch die Pore dringen und das zentrale Histidin so protonieren kann (4.4). Eine

veränderte Zellgröße von Hefen, was einen Wassereinstrom anzeigen könnte, wurde jedoch nicht durch die Expression der EcFocA-F75A/F202A/L79A/L89A-Variante beobachtet (Abbildung 3-30). MD-Simulationen postulieren, dass mit einem kationischen Histidin auch Wasser als Dipol in die Pore gezogen wird, dadurch den Solvatationsgrad des Substrates erhöht (Lv *et al.*, 2013) und eine Porenerweiterung die FNT in ein AQP umwandeln könnten (Atkovska und Hub, 2017). MD-Simulationen zeigten auch, dass mit positiv geladenem Histidin Wasser mit einer Rate von bis zu $2 \mu\text{s}^{-1}$ die FNT-Pore von EcYfdC, CdHSC und VcFocA passieren kann (Mukherjee *et al.*, 2020). Dies ist zwar deutlich langsamer als die Wasserleitfähigkeit durch ein klassisches Aquaporin ($3000 \mu\text{s}^{-1}$, Zeidel *et al.*, 1992), indiziert aber die Möglichkeit, dass die Passage von Wasser durch FNT nach Histidinprotonierung denkbar ist. Für AQP wurde eine Übertragbarkeit von durch MD-Simulationen bestimmte Raten auf experimentell bestimmte Raten bereits gezeigt (Groot und Grubmüller, 2001) und ließ vermuten, dass auch die MD-Daten zur Wasserleitfähigkeit durch FNT mit dem vermuteten protonierten Histidin experimentell belegbar sind.

4.6.1 Ein FNT kann durch die Erweiterung der Konstriktionen in einen aquaporinähnlichen Wasserkanal umgewandelt werden

Eine Prüfung auf Wasserleitfähigkeit zeigte deutlich den postulierten Wasser-Efflux für die konstriktionserweiterten EcFocA-Mutanten an (3.6.1, Abbildung 3-33). Bereits das Eröffnen einer Konstriktion reichte aus, um einen Wasserfluss zu beobachten, die Eröffnung beider Konstriktionen führte sogar zu einer noch schnelleren Wasserleitfähigkeit als die des TbAQP2 (Abbildung 3-34). So wurde das EcFocA in einen funktionsfähigen AQP-ähnlichen Kanal umgewandelt. Der Wasser-Efflux über Mutanten der exoplasmatischen Konstriktion war schneller als über jene mit Erweiterung der zytoplasmatischen Konstriktion. Demnach konnte die geschlossene innere Konstriktion von Wasser leichter passiert werden als die geschlossene äußere Konstriktion. Dies indiziert, dass die äußere Konstriktion, obwohl sie etwas weiter ist (Abbildung 1-6), etwas starrer ist.

Bei Umkehr des Gradienten zeigte sich, dass auch die Direktionalität des Wasserflusses gedreht werden konnte. Zwar waren die Geschwindigkeiten im hypertonen Medium nicht exakt dieselben wie im hypotonen Medium (Abbildung 3-35), jedoch war hier auch der Unterschied zwischen Hefen, die kein Protein heterolog exprimierten und solchen die das TbAQP2 exprimierten geringer. So ist

Diskussion

Die Anionenselektivität der FNT ist durch die Konstriktionen gegeben

in Relation zu den Kontrollen die Aussage noch immer belastbar. Das neu zugängliche Substrat Wasser spricht somit ebenfalls dagegen, dass die Lage der Mutation einen Einfluss auf die Direktionalität der Substratpassage hat (1.2.2.3, 4.3).

Auch *in-silico*-Solvatisierungen der Quadrupelmutante des EcFocA in Wasser zeigten, dass Wassermoleküle ausreichend Platz haben, die erweiterte Pore zu durchdringen (Abbildung 4-4). Zwar sind FNT-Poren nicht, wie die der AQP, hydrophil ausgekleidet, jedoch zeigt sich wie in dieser Arbeit als Hypothese postuliert (4.4) deutlich die Ausbildung einer Kette an Wassermolekülen, die sich durch die Pore legt und bis zum Histidin ragt (Abbildung 4-2).

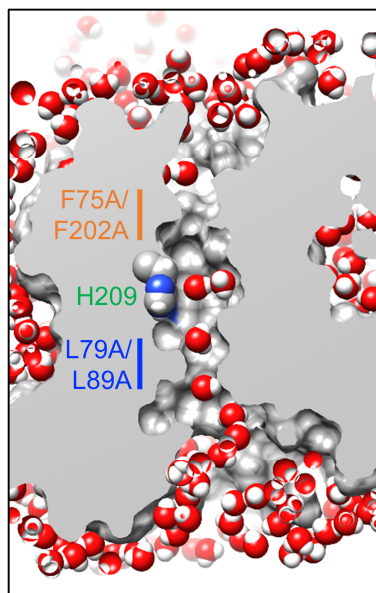


Abbildung 4-4: Die Quadrupelmutante EcFocA-F75A/F202A/L79A/L89A zeigt bei der *in-silico*-Solvatisierung eine Wasserkette in der erweiterten Pore. Modellierung durchgeführt von Prof. Dr. E. Beitz.

Mit der ermöglichten Wasserpassage konnten die hydrophoben Konstriktionen der FNT als Wasserbarriere ausgemacht werden, die im endogenen Zustand unter anderem für den Ausschluss von Wasser sorgen. Diese Daten unterstützen damit auch die dritte aufgestellte Hypothese, dass das Substrat bei erweiterter Konstriktion mit Hydrathülle oder zumindest mit einzelnen Wassermolekülen und damit anionisch in die FNT-Pore eindringen kann. Zudem ist es so möglich, dass Hydroxoniumionen das zentrale Histidin erreichen und es protonieren können. Berechnet man *in-silico* den Abstand vom zentralen Histidin zum nächsten Bulkwassermolekül (Tan *et al.*, 2013), zeigt sich, dass bei Eröffnung der Konstriktionen dieser Abstand geringer wird (Abbildung 4-5). Bei intakten Konstriktionen ist das nächste Wassermolekül noch über 11 Å entfernt, mit

Diskussion

Die Anionenselektivität der FNT ist durch die Konstriktionen gegeben

Einfacher Alanin-Substitution (EcFocA-L89A und -F75A) verringert sich der Abstand bereits auf 9 Å und halbiert sich nahezu für die Quadrupelmutante auf 6 Å (Abbildung 4-5).

Einzelne und nicht mit dem Bulkwasser verbundene Wassermoleküle innerhalb der Struktur sind mithilfe des angewandten Algorithmus bereits entfernt, und so bilden diese Berechnungen tatsächlich die Distanz zum nächsten bulkwasserverbundenen Wassermolekül ab (Chakravarty und Varadarajan, 1999). Auch Bulkwassergruppierungen von zwei Molekülen sind in den Mutanten noch deutlich näher am zentralen Histidin. Die EcFocA-F75N-Variante, die sich in allen untersuchten Experimenten wildtypähnlich verhält, zeigt hierbei stets gleiche Abstände wie der Wildtyp. Dies zeigt die Vereinbarkeit der *in-silico*-Berechnungen mit den experimentellen Daten und die damit aufgestellte Hypothese des eindringenden Wassers und untermauert diese damit.

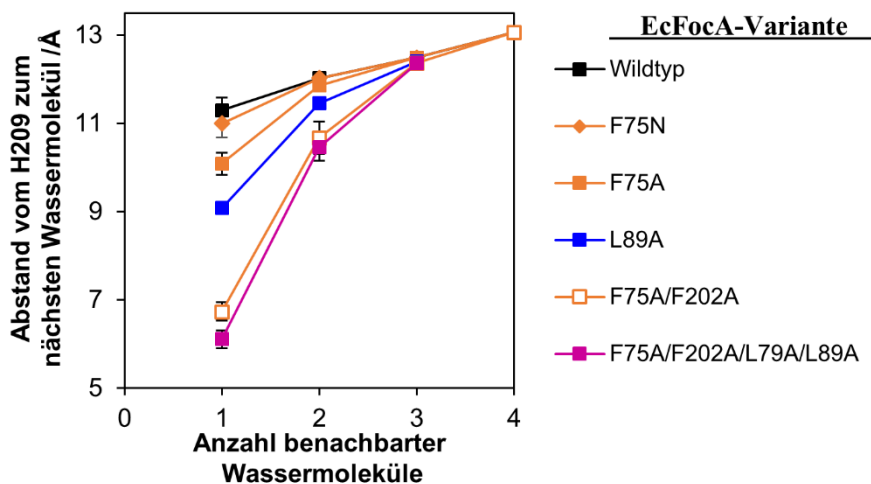


Abbildung 4-5: *In-silico* Solvatisierungen von EcFocA-Varianten zeigen den Abstand vom zentralen Histidin 209 zu den nächsten Bulkwassermolekül(en).

Mehrere Ergebnisse der Arbeit zeigen somit bereits ein durch Konstriktionserweiterung protoniertes Histidin an und dass dadurch die endogene Substratpassage versagt und zusätzlich Wasser die modulierten EcFocA-Varianten passieren kann (4.2, 4.4, 4.5, 4.6.1).

Strukturen von konstriktionserweiterten CdHSC-Mutanten (Abbildung 1-13) ließen das anionische und nicht das neutralisierte Substrat in der Pore vermuten (Czyzewski und Wang, 2012). Es wurde überlegt, dass das durch Konstriktionserweiterung protonierte Histidin ein anionisches Substratmolekül binden kann, und dadurch die endogene Substratpassage zum Erliegen kommt (4.5.1). Das Substrat würde dann wie ein Inhibitor die FNT-Pore verstopfen.

Diskussion

Die Anionenselektivität der FNT ist durch die Konstriktionen gegeben

Messungen der Substrataffinität bestätigten diese Hypothese nicht (4.5.1). Auch die Wasserpassage wurde durch Inkubation mit anionischen Substraten durch die EcFocA-Quadrupel-Mutante nicht unterbunden (3.6.1.3). Somit kann eine Inhibition der Substratpassage durch das endogene, anionische Substrat welches das protonierte Substrat bindet im Neutralen nicht gezeigt werden. Um eine Inhibition der Substratpassage durch das endogene anionische Substrat, zu beobachten, könnte die Messung im Sauren wiederholt werden, um mehr protoniertes zentrales Histidin vorliegen zu haben und den vermuteten Effekt zu verstärken (4.5.3).

Es lässt sich jedoch nicht gänzlich ausschließen, dass die Bindung zwischen anionischem Substrat und protoniertem Histidin nicht ausgebildet wurde oder ob Wasser trotzdem durch die Pore, an den gebundenen Substraten vorbei geleitet werden kann. Außerdem könnte das etwaig ionisch gebundene Substrat durch den deutlich höheren angelegten Wassergradienten verdrängt werden. Zur Prüfung dessen könnte die EcFocA-F75A-Variante analog untersucht werden, die weniger weit geöffnet ist und die Konzentration des Monocarboxylates während der Inkubation erhöht werden. Die Ergebnisse zeigen aber, dass eine Wasserleitfähigkeit durch Erweiterung der Konstriktionen gegeben ist, selbst in Anwesenheit des endogenen Substrates, und dass in diesem Falle Wasser bevorzugt die erweiterte Pore passiert.

4.6.2 Ein konstriktionserweitertes EcFocA leitet Protonen

In selektiv wasserleitenden AQP werden Protonen und Kationen durch Abstoßung von positiven Ladungen der AQP-Konstriktionen (Wu *et al.*, 2009; Wree *et al.*, 2011) sowie über die Reorientierung des Dipols der passierenden Wassermoleküle ausgeschlossen (Beitz *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011). Da den erweiterten FNT Wasser als Substrat zugänglich war, sollte geprüft werden, ob Protonen noch ausgeschlossen werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Assay entwickelt werden, der den Transfer von Protonen in Hefen und Hefeprotoplasten anzeigt, indem diese mit einem pH-sensitiven Fluoreszenzindikator beladen wurden (2.16.2). Dieser zeigt, dass für Wildtyp-EcFocA kaum ein Unterschied zum Hintergrundsignal vorlag. Für die Quadrupelmutante EcFocA-F75A/F202A/L79A/L89A, die die schnellste Wasserleitfähigkeit aufwies, zeigte sich hingegen ein eindeutiger Abfall des

Fluoreszenzsignals, und somit ein Einstrom von Protonen in die Hefen (Abbildung 3-38). So konnte ein Protonenfluss durch das konstriktionserweiterte EcFocA ausgemacht werden. Dies unterstreicht die Hypothese, dass das zentrale Histidin durch die Konstriktionserweiterung für Protonen zugänglich wird. Damit konnten die hydrophoben Konstriktionen zusätzlich als Protonenselektivitätsfilter in den FNT identifiziert werden. Dieser unterscheidet sich von dem Protonenfilter der strukturell verwandten AQP, da er keine positive Ladung aufweist. Es kann mit den Ergebnissen jedoch nicht unterschieden werden, ob die H_3O^+ -Ionen frei durch die Pore tunneln, oder ob sie durch einen Grotthuß-Mechanismus (Grotthuss, 1806; Pomès und Roux, 1996) entlang der sich bildenden Wasserkette auf die andere Seite der Zellmembran gelangen.

4.6.3 Sind die FNT-Konstriktionen ein unspezifischer Neutralteilchen und Kationenfilter?

An die Beobachtung der Wasser- und Protonendurchlässigkeit nach Konstriktionserweiterung schloss sich die Frage an, ob die Konstriktionen nicht nur diese Teilchen, sondern ganz allgemein vor Neutralteilchen und Kationen abschirmen. Dann würde die Pore mit erweiterten Konstriktionen nur noch rein gröÙenselektiv filtern.

Mit phänotypischen Assays in verschiedenen Hefezelllinien und dem bereits etablierten Radio-Assay wurden die Passage von neutralem Methylamin (3.6.3), kationischem Methylamin (3.6.4) und Glycerol (3.6.5) durch die generierten EcFocA-Varianten untersucht.

Auch hier zeigten Hefen der jeweilig verwendeten Zelllinie, die Kreuz-Mutanten exprimierten, eine längere Generationszeit als solche, die andere Varianten exprimierten (Abbildung 3-2, Abbildung 3-40, Abbildung 3-44). Das modulierte EcFocA, welches von der Hefe nicht kontrollierbar ist und als wasserleitender Kanal fungiert, sorgt für osmotischen Stress, wodurch das verlangsamte Wachstum zu erklären ist (4.6.1). Jedoch zeigten auch Einfachmutanten eine Wasserleitfähigkeit (3.6.1), die Generationszeit war bei den diese Varianten exprimierenden Hefen aber nicht so sehr verlangsamt wie bei Kreuz-Mutanten. Deshalb wurde vermutet, dass neben Wasser und Protonen ein weiteres Substrat den Kreuz-Mutanten zugänglich war, welches nicht durch Einfachmutanten geleitet wurde.

Diskussion

Die Anionenselektivität der FNT ist durch die Konstriktionen gegeben

Für alle generierten EcFocA-Kreuz-Mutanten, wurde eine Passage des neutralen Methylamins beobachtet (Abbildung 3-41, Abbildung 3-42, 3.6.3). Dies war nicht für die Mutanten mit nur einer erweiterten Konstriktion zu beobachten. Es lässt vermuten, dass bei Eröffnung beider Konstriktionen unspezifisch Neutralteilchen durch die Pore passen, wenn sie klein genug sind, um den Φ/K -Größenausschlussfilter zu passieren. Für das größere neutrale Molekül Glycerol (Abbildung 4-6) wurde konsistent mit dieser Vermutung keine Passage durch eine der getesteten EcFocA-Varianten beobachtet (3.6.5). Daraus lässt sich folgern, dass die hydrophoben Konstriktionen als unspezifische Neutralteilchenbarriere dienen.

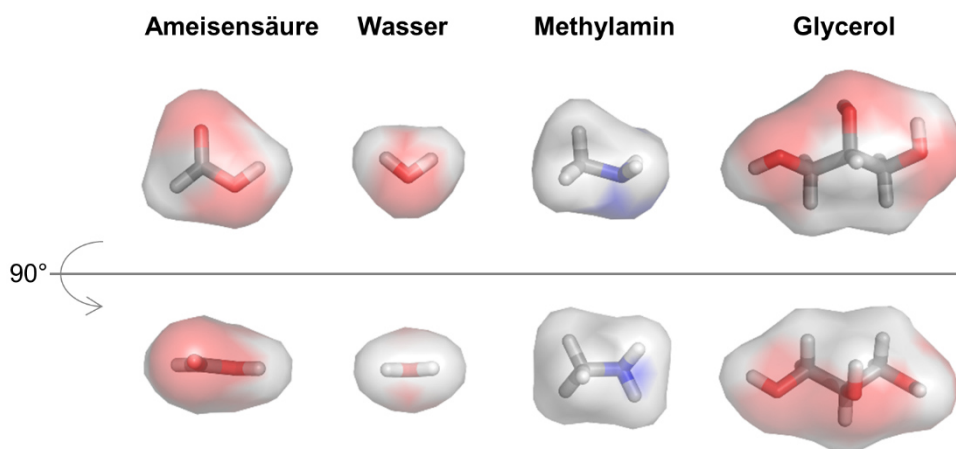


Abbildung 4-6: Größe des endogenen EcFocA-Substrates Ameisensäure im Vergleich zu den durch Erweiterung der Konstriktionen zugänglichen Substraten Wasser, Methylamin und dem unzugänglichen Glycerol. Kohlenstoff grau, Wasserstoff weiß, Sauerstoff rot. Die halbdurchsichtige Hülle stellt die Connolly-Oberfläche dar.

Da kleine neutrale Teilchen auch ohne Kanalprotein biologische Membranen passieren können, mag dies nicht der Hauptgrund für den hohen Konservierungsgrad der hydrophoben Konstriktionen der FNT sein. Dennoch kann die hohe Spezifität für monovalente Anionen in der FNT-Familie gewährleistet und erklärt werden. Eine Begründung, warum der Ausschluss von physiologisch vorkommenden kleinen Neutralteilchen trotzdem sinnvoll ist, ist die Geschwindigkeit, mit der die erleichterte Diffusion über Kanäle stattfindet. So kann z.B. Wasser biologische Membranen auch in kleinen Mengen passieren (zu erkennen an den Kurven der Hefen die mit Leerplasmid transformiert waren, im *stopped-flow*-Wasser-Efflux-Assay, graue Kurve in Abbildung 3-33), jedoch mit deutlich langsamerer Rate. So sollte die unspezifische, schnelle Passage von Teilchen durch ein Membranprotein stets unterbunden sein, um zytosolischen Konzentrationen besser zu kontrollieren und aufrecht zu erhalten. Als weitere

Diskussion

Die Anionenselektivität der FNT ist durch die Konstriktionen gegeben

kleine Neutralteilchen, die neben den nachgewiesenen Stoffen Wasser und Methylamin durch die hydrophoben Konstriktionen ausgeschlossen werden könnten, wären Ethanol, Ammoniak oder Wasserstoffperoxid denkbar.

Die Testung auf Passage von kationischem, protoniertem Methylamin lieferte Indizien dafür, dass auch dieses die EcFocA-Varianten mit erweiterten Konstriktionen passieren kann (3.6.4). Studien am EcYfdC zeigten ebenfalls, dass bei modulierten konservierten Regionen die Passage von Kationen durch ein FNT möglich wird (Mukherjee *et al.*, 2020). Zwar zeigten Hefen, die den Ammoniumtransporter LeAMT1;1 exprimierten die Passage im gewählten Assay nur schwach an. Jedoch lässt sich durch das Ausbleiben des Wachstums der die modulierten Varianten exprimierenden Hefen im verwendeten Intoxikations-Assay vermuten, dass auch kleine Kationen nach Konstriktionserweiterung die FNT passieren können und diese sonst durch intakte Konstriktionen ausgeschlossen werden. Um die Passage des kationischen Methylamins durch konstriktionserweiterte FNT zu bestätigen, sollte der Assay mit einer aussagekräftigen, schneller leitenden Kontrolle (etwa ein anderer Vertreter der Methylamin-Permease-Familie; Zheng *et al.*, 2004) wiederholt werden.

Auch für die unspezifische Kationenpassage sind physiologisch relevante kleine Solute denkbar, die den Φ/K -Filter passieren könnten und deshalb von der Passage durch FNT abgeschirmt werden sollten. Es kommen etwa Ammonium oder Kalium in Frage. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, mit phänotypischen Assays die Passage von Kalium und Ammonium zu untersuchen, die verwendeten Assays konnten jedoch nicht endgültig etabliert werden und ließen so keine Schlüsse zu (siehe Anhang, 6.1, 6.2).

Alle Ergebnisse zur Erweiterung des Substratspektrums nach Konstriktionserweiterung zeigen also Wasser und neutrales Methylamin als Neutralteilchen sowie Protonen als Kation als neu zugängliche Substrate an. Zudem deuten die Ergebnisse darauf hin, dass auch protoniertes und damit kationisches Methylamin die FNT-Pore passieren kann. Demnach verhindern im Wildtyp-EcFocA die Konstriktionen die Passage von kleinen Neutralteilchen, die sonst den Größenausschlussfilter passieren könnten und schirmen durch ihre Hydrophobizität gleichzeitig kleine kationische Solute ab. So kann den Konstriktionen eine Filterfunktion gegenüber Wasser, neutralen und kationischen

kleinen Soluten sowie Protonen zugesprochen werden. Sie bedingen dadurch im Umkehrschluss die Anionenselektivität der FNT.

4.7 Die hydrophoben Konstriktionen bedingen und ergänzen den *dielectric-slide*-Mechanismus

Die Ergebnisse der Experimente dieser Arbeit zeigen unter anderem, dass die Konstriktionen als Wasserbarriere dienen und dass bei Konstriktionserweiterung Wasser bis zur Porenmitte eindringen oder sogar ganz durch die Pore hindurch geleitet wird (3.6.1, 3.6.1.3). Gleichzeitig versagte mit diesen Erweiterungen die pH-abhängige Substratpassage (3.2). Diese Ergebnisse lassen sich nun im Kontext der ausformulierten Transportmechanismen einordnen.

4.7.1 Die Substratprotonierung erfolgt nicht durch das zentrale Histidin

Dem *proton-relay*-Mechanismus nach (Lü *et al.*, 2013) wird das Substrat von einem protonierten Histidin in die FNT-Pore gezogen. Das Proton wird über die His-H₂O-Thr-Kette kurzzeitig auf das Substrat übertragen (1.2.2.1) und dann intern recycelt (neutraler pH) oder mit-geleitet (saurer pH). Dringt nun in diesem Kontext Wasser mit in die Pore, ist das Histidin leichter zu protonieren (4.5.3) und könnte auch eher das Proton für den *proton relay* zu Verfügung stellen. Dieser Effekt sollte sich im Säuren, bei mehr Protonenverfügbarkeit, verstärken. So sollten konstriktionserweiterte FNT im Säuren dem *proton-relay*-Mechanismus nach schnelleren Raten zeigen als der Wildtyp.

Dem *dielectric-slide*-Mechanismus nach (Wiechert und Beitz, 2017a) erfolgt die Substratattraktion über die positive Ladung der zytosolischen Oberfläche bzw. der hoch-konservierten Lysine im Vestibül des FNTs. Dort verschiebt sich durch die hydrophobe Umgebung die Dielektrizitätskonstante. So wird eine Ladung innerhalb der Pore energetisch ungünstiger und die Protonierung des Substrates ausgehend vom Bulkwasser erleichtert. Dieser Effekt sollte bei Eindringen von Bulkwasser in die Pore gehemmt werden, da Wassermoleküle als Dipol vor der hydrophoben Umgebung abschirmen würden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zum Verlust der pH-gekoppelten initialen Transportraten (4.4) zusammen mit den Ergebnissen der Wasser- und Protonenleitfähigkeit (4.6.1, 4.6.2) durch Konstriktionserweiterung sowie erhöhter

Diskussion

Die hydrophoben Konstriktionen bedingen und ergänzen den *dielectric-slide*-Mechanismus

Aktivierungsenergien (4.5.2) und verlangsamten maximalen Transportraten (4.5.1) untermauern demnach den *dielectric-slide*-Mechanismus.

Am eukaryotischen PffNT wurden zusätzlich Untersuchungen mit schwerem Wasser durchgeführt, um die Frage nach dem Mechanismus der Substratpassage zu beleuchten (3.5). Besonders eindrücklich wird ein Schwerwassereffekt, wenn man ihn in Abhängigkeit eines Parameters misst, der die Aktivität des Proteins moduliert (Northrop, 2001). Diese Aussage kann mit den in dieser Arbeit getätigten Ergebnissen zum Aufnahmeverhalten durch PffNT bestätigt werden. Es ergibt sich im Neutralen ein cSKIE, der die Verlangsamung der Ratenkonstante unter Einsatz von Deuterium anzeigt und auch für das EcFocA und Formiat beschrieben war (Wiechert und Beitz, 2017b). Auch im Sauren blieb dieser Effekt erhalten. Dieser klassische Schwerwassereffekt lässt sich wie folgt erklären: Eine Bindung zu ^2D ist stärker als eine Bindung zu ^1H (Urey *et al.*, 1932). So bricht eine Bindung zu ^2D langsamer als eine Bindung zu ^1H . Damit wird auch die Ratenkonstante einer Reaktion, bei der ein Wasserstoff-Ion übertragen wird, langsamer. Dieser Effekt ist demnach unabhängig von der Lyonium-Ionen-Konzentration und auch im Sauren zu vermerken.

Betrachtet man diese Ergebnisse wieder im Kontext der beiden ausformulierten Substratpassage-Mechanismen, sprechen sie erneut für den *dielectric-slide*-Mechanismus. Die Reduktion der Ratenkonstante in schwerem Wasser müsste bei mehr als einem Bindungsbruch deutlich stärker sein, da jeweils ein Faktor von ca. 40 % zum Tragen kommt (DeCoursey und Cherny, 1997). Dies ist nicht der Fall (Abbildung 3-29) und spricht somit gegen den *proton-relay*-Mechanismus der mindestens zwei Bindungsbildungen bzw. -brüche involviert (vom zentralen Histidin auf das Substrat und wieder zurück auf die His-H₂O-Thr-Kette).

Es konnte neben dem cSKIE zu beiden pL-Werten ein iSEIE beobachtet werden, der anzeigt, dass die Lage des Gleichgewichtes in schwerem Wasser zu Seiten der Aufnahme in die Hefen hin verschoben ist (Abbildung 3-28). Inverse Schwerwassereffekte sind selten, können aber ebenfalls durch die festere bzw. bevorzugte Bindung von Deuterium zu den beteiligten Reaktionspartnern erklärt werden (Anslyn und Dougherty, 2006). Sie könne zum Beispiel anzeigen, dass geschwindigkeitsbestimmende Schritte nicht innerhalb eines Proteins stattfinden oder diese kein Proton involvieren (Fernandez und Murkin, 2020).

Diskussion

Die hydrophoben Konstriktionen bedingen und ergänzen den dielectric-slide-Mechanismus

Carboxylate präferieren die Bindung zu D⁺-Ionen über H⁺-Ionen (Erlenmeyer *et al.*, 1937). Daraus ergibt sich in D₂O ein um 0,4 erhöhter pK_s-Wert für Carbonsäuren (Bell und Kuhn, 1963). Der pK_s für L-Laktat innerhalb des PffNTs ist dem *dielectric-slide*-Mechanismus nach in Wasser auf 5,8 erhöht (Wiechert und Beitz 2017b). Für D₂O ergibt sich damit ein pK_s-Wert von 6,2. So kann bei Messbedingungen von pL 6,8 in D₂O mehr Substrat in die neutrale Transportform überführt und geleitet werden, weil der Unterschied zwischen Messpuffer pH und pK_s des Substrates kleiner ist. Ein iSEIE ist zu beobachten (Abbildung 3-29).

Messbedingungen von pL 5,8 hingegen sind an bzw. unterhalb pH = pK_s des Substrates innerhalb des Proteins. Daher wird in beiden Lösungsmitteln viel transportfähiges Substrat innerhalb des Proteins gebildet (1.1). Damit verringert sich das Ausmaß des iSEIEs (Abbildung 3-29). Diese Erklärung lässt sich nicht auf den *proton-relay*-Mechanismus übertragen, da er keine Verschiebung der Säurestärke beschreibt. Es sollte dem *proton-relay*-Mechanismus nach kein iSEIE zu beobachten sein oder er sollte sich nicht über die pL-Senkung ändern.

Die Ergebnisse des iSEIE und cSKIE für das PffNT sprechen damit gegen den *proton-relay*-Mechanismus. Sie untermauern demnach die These, dass mit intakten Konstriktionen das zentrale Histidin nicht protoniert vorliegt. In Anbetracht dieser Ergebnisse könnte untersucht werden, welches Verhalten ein FNT mit eröffneter Konstriktion in D₂O zeigt. Ist die Substratprotonierung wie vermutet nicht mehr durch das FNT erleichtert (4.4), sollten sich die maximalen Aufnahmekapazitäten annähern. Ein solcher Effekt ist beispielsweise für das hAQP9 unter denselben Messbedingungen wie in dieser Arbeit verwendet zu beobachten. Hier unterscheidet sich die Gleichgewichtslage zwischen D₂O und H₂O nicht, da das Protein die Substratprotonierung nicht vermitteln kann (unveröffentlichte Daten; persönliche Mitteilung von Katharina Geistlinger).

4.7.2 Das Zusammenspiel der hydrophoben Konstriktionen und dem zentralen Histidin in FNT

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt sich begründen, dass intakte FNT-Konstriktionen essenziell für die Passage von schwachen Säuren mit Proton durch FNT sind. Sie dienen nicht nur als Filterregion für Wasser, sondern auch für Protonen und andere kleine nicht-anionische Solute. Es wurden Anhaltspunkte dafür geliefert, dass eine ebenso essentielle Funktion der beiden hydrophoben

Diskussion

Die hydrophoben Konstriktionen bedingen und ergänzen den dielectric-slide-Mechanismus

Konstriktionen der Schutz des zentralen hochkonservierten Histidins vor Protonierung ist (4.5). Dies gelingt durch das Unterbrechen einer Wasserkette, die sich sonst durch die FNT-Pore ausbilden könnte und eine Protonenleitung zum zentralen Histidin ausbilden würde (4.6.1). Dies erklärt auch, warum es zwei Konstriktionen, eine auf zytoplasmatischer und eine auf exoplasmatischer Seite, geben muss. Für einen Größenausschlussfilter reicht hingegen bereits eine Verjüngung der Pore (Hub und Groot, 2008; Savage *et al.*, 2010). So wird auch durch die zweifache Ausführung der hydrophoben Konstriktion indiziert, dass ihnen eine andere Rolle als die der Größenselektion zukommt.

4.7.2.1 Vergleich zu anderen Kanälen mit Konstriktionen

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen deutliche Unterschiede zu den strukturell verwandten AQP (1.2.1.1), die durch nur eine Konstriktion (sog. ar/R-Region, Abbildung 4-7) Protonen und gleichzeitig zu große Substratmoleküle ausschließen, aber Wasser leiten (Fu *et al.*, 2000; Sui *et al.*, 2001; Beitz *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2009; Eriksson *et al.*, 2013). Die Innenauskleidung der AQP-Pore ist deutlich hydrophiler als die der FNT und trägt kein zentrales Histidin (Murata *et al.*, 2000). Die weitere hoch-konservierte Asparagin-Prolin-Alanin-(NPA)-Region, verjüngt die Pore nicht (Murata *et al.*, 2000).

Diese Eigenschaften nähern die FNT hingegen der Amt/Mep/Rh-Familie der Ammoniumtransporter (Khademi *et al.*, 2004) an, die ebenfalls hydrophobe Konstriktionen aus Phenylalaninen um zwei zentrale Histidine innerhalb der Pore aufweisen (Khademi und Stroud, 2006, Abbildung 4-7). Auch hier sind die zentralen Histidine und die sie umgebenden Konstriktionen hoch-konserviert (Andrade und Einsle, 2007). Diese Ähnlichkeit wurde bereits mit dem Postulieren des *dielectric-slide-Mechanismus* erwähnt (Wiechert und Beitz 2017b). Analog der Substratpassage durch FNT, muss zur Passage ein Ion neutralisiert werden. Nur in diesem Falle genau anders herum: kationisches Ammonium muss zum neutralen Ammoniak deprotoniert werden, um die neutrale Transportpore zu passieren. Es ist beschrieben, dass die π - π -Wechselwirkung der Histidine die neutrale Transportform des Substrates stabilisiert (Khademi *et al.*, 2004). Auch hier sinkt die Säurestärke des Substrates innerhalb der Pore und ermöglicht so die Deprotonierung der Base. Sind neutrale Histidine wie in den FNT- oder Amt/Mep/Rh-Konstriktionen von Phenylalaninen umgeben, sind die resultierenden π - π -Wechselwirkung zwischen den Aminosäureresten ebenfalls stabilisiert und

Diskussion

Die hydrophoben Konstriktionen bedingen und ergänzen den dielectric-slide-Mechanismus

sogar stärker als van-der-Waals-Kräfte (Liao *et al.*, 2013). Strukturell unterscheiden sich die Amt/Mep/Rh-Kanäle jedoch mit elf TM und dem Ausbilden eines Homotrimerers mit exoplasmatischem N-Terminus deutlich von den FNT (Andrade und Einsle, 2007). So kann auch mit analogen Vertretern die Plausibilität des postulierten FNT-Transport-Mechanismus und die Funktion der zugehörigen Struktur hierbei untermauert werden.

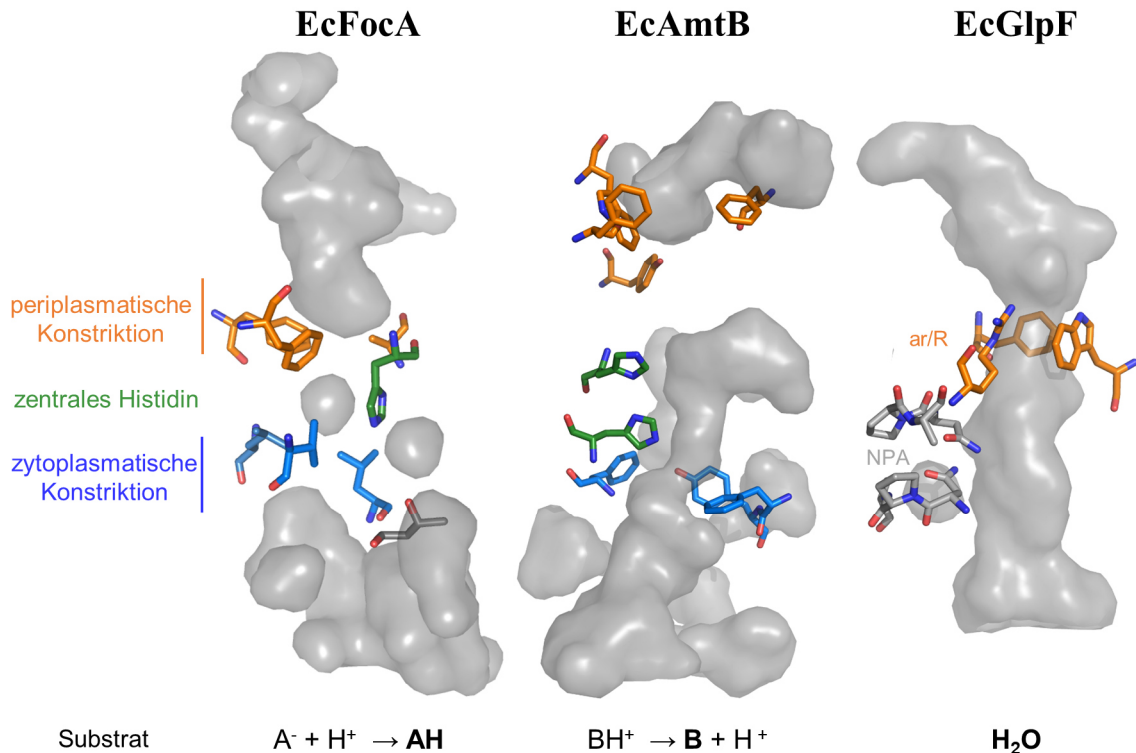


Abbildung 4-7: Vergleich der Konstriktionen des EcFocA, des Ammoniumtransporters EcAmtB und AQP EcGlpF. Alle weisen eine periplasmatische Konstriktion (orange) auf. Nur EcFocA und EcAmtB tragen ein oder zwei zentrale Histidine (grün) und eine zweite, zytoplasmatische Konstriktion (blau). Das EcGlpF trägt zytoplasmatisch das AQP-typische NPA-Motiv (grau). Die Lösungsmittelzugängliche Oberfläche ist grau dargestellt. Unten: Reaktion zur Neutralisation zur transportfähigen Form des Substrates (A = Säure, B = Base, fett). Das EcGlpF leitet bereits neutrale Wassermoleküle.

4.7.2.2 Ein ergänzter *dielectric-slide*-Mechanismus

Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen den *dielectric-slide*-Mechanismus (4.2-4.6) und lassen ihn wie folgt erweitern (Abbildung 4-8). Ein Substrat muss, um ein FNT zu passieren, zwei Kontrollstellen (Checkpoints) passieren. Der erste Checkpoint selektiert auf die anionische Ladung. Wie für monocarboxylat- bzw. milchsäureleitende Kanäle und Transporter üblich, geschieht dies über eine positive Ladung (Rothert *et al.*, 2017; Wiechert und Beitz, 2017a; Köpnick *et al.*, 2021). Diese wird durch hoch-konservierte Lysine in den Vestibülen bzw. durch die zytoplasmatisch positive Oberflächenelektrostatik und nicht über ein protoniertes

Diskussion

Die hydrophoben Konstriktionen bedingen und ergänzen den dielectric-slide-Mechanismus

Histidin ausgebildet. Der zweite Checkpoint selektiert auf die Fähigkeit, neutralisiert zu werden. Die hydrophobe Umgebung der Konstriktionen und des neutralen Histidins zwingt das anionische Substrat zur Neutralisation. Kann die Ladung nicht aufgehoben werden, kann es nicht passieren. So lässt sich die Selektivität für schwache, monovalente Säuren der FNT erklären (1.2, Abbildung 4-8). Die Ergebnisse dieser Arbeit zur Funktion der hydrophoben Konstriktionen in den FNT beschreiben so eine feine Abstimmung von Enge der Konstriktionen mit der FNT-Poren-Struktur, die eines konservierten, neutralen Histidins bedarf.

Bidirektionale Substratpassage durch FNT:

1. Checkpoint:

Ist das Substrat ein Anion?

Attraktion über positiv geladenes Lysin, erleichterte Protonierung im hydrophoben Vestibül durch pK_S -shift.

2. Checkpoint:

Wurde das Anion protoniert?

Kontrolle durch hydrophobe Umgebung, Passage durch konstant neutrale Pore.

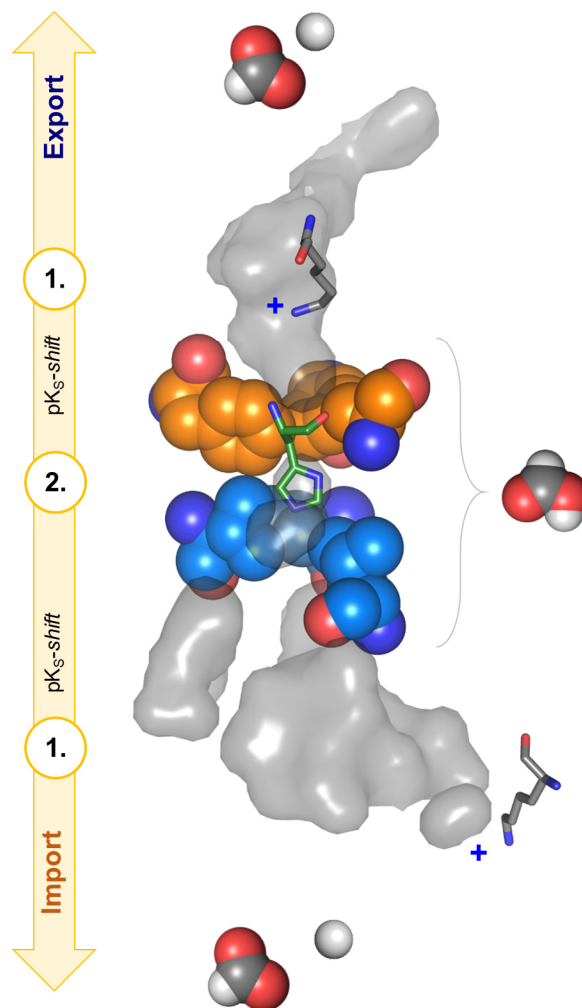


Abbildung 4-8: Um bidirektional eine FNT-Pore zu passieren, muss das anionische Substrat der schwachen Säure zwei Kontrollstellen passieren: 1. Checkpoint: Die positive Ladung eines Lysins im Porenvestibül. Nur anionische Substrate werden in den Poreneingang gezogen, wo sich die Säurestärke senkt, um die Protonierung durch das Bulkwasser zu erleichtern. 2. Checkpoint: Die jeweilig erste hydrophobe Konstriktion innerhalb der Kernporenregion. Es erfolgt eine zweite Selektion auf Neutralisation. Das Substrat muss innerhalb des hydrophoben Vestibüls ein Proton binden, um die hydrophoben Konstriktionen zu passieren. So werden gleichzeitig alle sonstigen geladenen Teilchen ausgeschlossen. Die Dopplung der Konstriktionen bedingt, dass das zentrale Histidin konstant neutral bleibt. Dieser ergänzte *dielectric-slide*-Mechanismus ist beispielhaft dargestellt an der Passage von Formiat und Proton in Form der Ameisensäure durch das EcFocA.

5 | Literatur

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. und Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215, 403–410. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Amm I., Sommer T. und Wolf D.H. (2014) Protein quality control and elimination of protein waste: the role of the ubiquitin-proteasome system. *Biochim. Biophys. Acta*, 1843, 182–196. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.031.
- Anderson J.A., Huprikar S.S., Kochian L.V., Lucas W.J. und Gaber R.F. (1992) Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 3736–3740. DOI: 10.1073/pnas.89.9.3736.
- Andrade S.L.A. & Einsle O. (2007) The Amt/Mep/Rh family of ammonium transport proteins. *Mol. Membr. Biol.*, 24, 357–365. DOI: 10.1080/09687680701388423.
- Anslyn, E.V. und Dougherty, D.A. (2006) *Modern Physical Organic Chemistry*. University Science Books, Canada.
- Atkovska K. und Hub J.S. (2017) Energetics and mechanism of anion permeation across formate-nitrite transporters. *Sci. Rep.*, 7, 12027. DOI: 10.1038/s41598-017-11437-0.
- Bader A. und Beitz E. (2020) Transmembrane facilitation of lactate/H⁺ instead of lactic acid is not a question of semantics but of cell viability. *Membranes*, 10. DOI: 10.3390/membranes10090236.
- Beitz E. (2000) TEXshade: shading and labeling of multiple sequence alignments using LATEX2 epsilon. *Bioinformatics*, 16, 135–139. DOI: 10.1093/bioinformatics/16.2.135.
- Beitz E., Wu B., Holm L.M., Schultz J.E. und Zeuthen T. (2006) Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103, 269–274. DOI: 10.1073/pnas.0507225103.
- Belaich A. und Belaich J.P. (1976) Microcalorimetric study of the anaerobic growth of *Escherichia coli*: growth thermograms in a synthetic medium. *J. Bacteriol.*, 125, 14–18. DOI: 10.1128/jb.125.1.14-18.1976.
- Bell R.P. & Kuhn A.T. (1963) Dissociation constants of some acids in deuterium oxide. *Trans. Faraday Soc.*, 59, 1789. DOI: 10.1039/TF9635901789.
- Beyer L., Doberenz C., Falke D., Hunger D., Suppmann B. und 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. DOI: 10.1128/JB.02166-12.

Literatur

- Bienert G.P., Desguin B., Chaumont F. und Hols P. (2013) Channel-mediated lactic acid transport: a novel function for aquaglyceroporins in bacteria. *Biochem. J.*, 454, 559–570. DOI: 10.1042/BJ20130388.
- Borisov V.B. und Forte E. (2021) Impact of hydrogen sulfide on mitochondrial and bacterial bioenergetics. *Int. J. Mol. Sci.*, 22. DOI: 10.3390/ijms222312688.
- Boron W.F. (2004) Regulation of intracellular pH. *Adv. Physiol. Educ.*, 28, 160–179. DOI: 10.1152/advan.00045.2004.
- Bracey D., Holyoak C., Nebe-von Caron G. und Cooté P. (1998) Determination of the intracellular pH (pHi) of growing cells of *Saccharomyces cerevisiae*: the effect of reduced-expression of the membrane H⁺-ATPase. *J. Microbiol. Methods*, 31, 113–125. DOI: 10.1016/S0167-7012(97)00095-X.
- Brønsted J.N. (1923) Einige Bemerkungen über den Begriff der Säuren und Basen. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, 42, 718–728. DOI: 10.1002/recl.19230420815.
- Casal M., Paiva S., Andrade R.P., Gancedo C. und Leão C. (1999) The lactate-proton symport of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by JEN1. *J. Bacteriol.*, 181, 2620–2623. DOI: 10.1128/JB.181.8.2620-2623.1999.
- Chakravarty S. und Varadarajan R. (1999) Residue depth: A novel parameter for the analysis of protein structure and stability. *Structure*, 7, 723–732. DOI: 10.1016/s0969-2126(99)80097-5.
- Choi W.-G. und Roberts D.M. (2007) Arabidopsis NIP2;1, a major intrinsic protein transporter of lactic acid induced by anoxic stress. *J. Biol. Chem.*, 282, 24209–24218. DOI: 10.1074/jbc.M700982200.
- Clayden J., Greeves N., Warren S.G. und Godesen B. (2017) *Organische Chemie*. Springer, Berlin, Germany.
- Clegg S., Yu F., Griffiths L. und Cole J.A. (2002) The roles of the polytopic membrane proteins NarK, NarJ and NirC in *Escherichia coli* K-12: two nitrate and three nitrite transporters. *Mol. Microbiol.*, 44, 143–155. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02858.x.
- Cole J. (1996) Nitrate reduction to ammonia by enteric bacteria: redundancy, or a strategy for survival during oxygen starvation? *FEMS Microbiol. Lett.*, 136, 1–11. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08017.x.
- Conde A., Diallinas G., Chaumont F., Chaves M. und Gerós H. (2010) Transporters, channels, or simple diffusion? Dogmas, atypical roles and complexity in transport systems. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 42, 857–868. DOI: 10.1016/j.biocel.2009.12.012.
- Cook G.M., Russell J.B., Reichert A. und Wiegel J. (1996) The intracellular pH of *Clostridium paradoxum*, an anaerobic, alkaliphilic, and thermophilic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4576–4579. DOI: 10.1128/aem.62.12.4576-4579.1996.

- Czyzewski B.K. und Wang D.-N. (2012) Identification and characterization of a bacterial hydrosulphide ion channel. *Nature*, 483, 494–497. DOI: 10.1038/nature10881.
- DeCoursey T.E. und Cherny V.V. (1997) Deuterium isotope effects on permeation and gating of proton channels in rat alveolar epithelium. *J. Gen. Physiol.*, 109, 415–434. DOI: 10.1085/jgp.109.4.415.
- Doberenz C., Zorn M., Falke D., Nannemann D., Hunger D., Beyer L., Ihling C.H., Meiler J., Sinz A. und Sawers R.G. (2014) Pyruvate formate-lyase interacts directly with the formate channel FocA to regulate formate translocation. *J. Mol. Biol.*, 426, 2827–2839. DOI: 10.1016/j.jmb.2014.05.023.
- Eriksson U.K., Fischer G., Friemann R., Enkavi G., Tajkhorshid E. und Neutze R. (2013) Subangstrom resolution X-ray structure details aquaporin-water interactions. *Science (New York, N.Y.)*, 340, 1346–1349. DOI: 10.1126/science.1234306.
- Erlenmeyer H., Schoenauer W., und Schwarzenbach G. (1937) Über Austauschversuche in Wasser und Deuteriumoxyd. *Helv. Chim. Acta* 20, 726-732. DOI: 10.1002/hlca.193702001105
- Faghiri Z. und Skelly P.J. (2009) The role of tegumental aquaporin from the human parasitic worm, *Schistosoma mansoni*, in osmoregulation and drug uptake. *FASEB J.*, 23, 2780–2789. DOI: 10.1096/fj.09-130757.
- Falke D., Schulz K., Doberenz C., Beyer L., Lilie H., Thiemer B. und 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. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01862.x.
- Feng Z., Hou T. und Li Y. (2012) Concerted movement in pH-dependent gating of FocA from molecular dynamics simulations. *J. Chem. Inf. Model.*, 52, 2119–2131. DOI: 10.1021/ci300250q.
- Fernandez P.L. und Murkin A.S. (2020) Inverse Solvent Isotope Effects in Enzyme-Catalyzed Reactions. *Molecules*, 25. DOI: 10.3390/molecules25081933.
- Fu D., Libson A., Miercke L.J., Weitzman C., Nollert P., Krucinski J. & Stroud R.M. (2000) Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science*, 290, 481–486. DOI: 10.1126/science.290.5491.481.
- Geistlinger K., Schmidt J.D.R. & Beitz E. (2022) Lactic Acid Permeability of Aquaporin-9 Enables Cytoplasmic Lactate Accumulation via an Ion Trap. *Life*, 12. DOI: 10.3390/life12010120.
- Gietz R.D., Schiestl R.H., Willems A.R. und Woods R.A. (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 11, 355–360. DOI: 10.1002/yea.320110408.

- Golldack A., Henke B., Bergmann B., Wiechert M., Eler H., Blancke Soares A., Spielmann T. und Beitz E. (2017) Substrate-analogous inhibitors exert antimalarial action by targeting the Plasmodium lactate transporter PfFNT at nanomolar scale. PLoS Pathog., 13, e1006172. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006172.
- Gonen T., Cheng Y., Sliz P., Hiroaki Y., Fujiyoshi Y., Harrison S.C. und Walz T. (2005) Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals. Nature, 438, 633–638. DOI: 10.1038/nature04321.
- Grollman E.F., Philp N.J., McPhie P., Ward R.D. und Sauer B. (2000) Determination of transport kinetics of chick MCT3 monocarboxylate transporter from retinal pigment epithelium by expression in genetically modified yeast. Biochemistry, 39, 9351–9357. DOI: 10.1021/bi000464.
- Groot B.L. de und Grubmüller H. (2001) Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. Science, 294, 2353–2357. DOI: 10.1126/science.1066115.
- Grotthuss C. de (1806) Theory of decomposition of liquids by electrical currents. Ann. Chim., 54–74.
- Hajek P., Bader A., Helmstetter F., Henke B., Arnold P. und Beitz E. (2019) Cell-free and yeast-based production of the malarial lactate transporter, PfFNT, delivers comparable yield and protein quality. Front. Pharmacol., 10, 375. DOI: 10.3389/fphar.2019.00375.
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol., 166, 557–580. DOI: 10.1016/s0022-2836(83)80284-8.
- Hanneschlaeger C., Horner A. und Pohl P. (2019) Intrinsic Membrane Permeability to Small Molecules. Chem. Rev., 119, 5922–5953. DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00560.
- Helmstetter F., Arnold P., Höger B., Petersen L.M. und Beitz E. (2019) Formate-nitrite transporters carrying nonprotonatable amide amino acids instead of a central histidine maintain pH-dependent transport. J. Biol. Chem., 294, 623–631. DOI: 10.1074/jbc.RA118.006340.
- Holleman A.F., Wiberg E. und Nils W. (2019) Holleman/Wiberg: Lehrbuch der anorg. Chemie. Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston.
- Holm-Bertelsen J. (2016) Expressionssysteme zur Gewinnung von rekombinantem PfFNT zur Reinigung, Funktionsuntersuchung und Kristallisation. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Holm-Bertelsen J., Bock S., Helmstetter F. und 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. DOI: 10.1016/j.pep.2016.06.008.
- Horikoshi K., (2011) Extremophiles Handbook. Springer Japan, Tokyo.

- Hub J.S. und Groot B.L. de (2008) Mechanism of selectivity in aquaporins and aquaglyceroporins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105, 1198–1203. DOI: 10.1073/pnas.0707662104.
- Hunger D., Doberenz C. und 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. DOI: 10.1515/hsz-2014-0154.
- Kammel M., Hunger D. und Sawers R.G. (2021) The soluble cytoplasmic N-terminal domain of the FocA channel gates bidirectional formate translocation. *Mol. Microbiol.*, 115, 758–773. DOI: 10.1111/mmi.14641.
- Kammel M. und Sawers R.G. (2022) The FocA channel functions to maintain intracellular formate homeostasis during *Escherichia coli* fermentation. *Microbiology (Reading, U. K.)*, 168. DOI: 10.1099/mic.0.001168.
- Kammel M., Trebbin O., Pinske C. und Sawers R.G. (2022a) A single amino acid exchange converts FocA into a unidirectional efflux channel for formate. *Microbiology (Reading, U. K.)*, 168. DOI: 10.1099/mic.0.001132.
- Kammel M., Trebbin O. und Sawers R.G. (2022b) Interplay between the conserved pore residues Thr-91 and His-209 controls formate translocation through the FocA channel. *Microb. Physiol.* DOI: 10.1159/000524454.
- Khademi S., O'Connell J., Remis J., Robles-Colmenares Y., Miercke L.J.W. und Stroud R.M. (2004) Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. *Science (New York, N.Y.)*, 305, 1587–1594. DOI: 10.1126/science.1101952.
- Khademi S. und Stroud R.M. (2006) The Amt/MEP/Rh family: structure of AmtB and the mechanism of ammonia gas conduction. *Physiology (Bethesda)*, 21, 419–429. DOI: 10.1152/physiol.00051.2005.
- Kimura H. (2014) Production and physiological effects of hydrogen sulfide. *Antioxid. Redox Signal.*, 20, 783–793. DOI: 10.1089/ars.2013.5309.
- Köpnick A.-L., Jansen A., Geistlinger K., Epalle N.H. und Beitz E. (2021) Basigin drives intracellular accumulation of L-lactate by harvesting protons and substrate anions. *PloS one*, 16, e0249110. DOI: 10.1371/journal.pone.0249110.
- Krenc D. (2012) Studies on the ammonia permeability of aquaporins. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Krenc D., Wu B. und Beitz E. (2013) Specific aquaporins increase the ammonia tolerance of a *Saccharomyces cerevisiae* mep1-3 fps1 deletion strain. *Mol. Membr. Biol.*, 30, 43–51. DOI: 10.3109/09687688.2012.733976.
- Larsson J.T., Rogstam A. und von Wachenfeldt C. (2005) Coordinated patterns of cytochrome bd and lactate dehydrogenase expression in *Bacillus subtilis*. *Microbiology (Reading, U. K.)*, 151, 3323–3335. DOI: 10.1099/mic.0.28124-0.

Literatur

- Li H., Chen H., Steinbronn C., Wu B., Beitz E., Zeuthen T. und Voth G.A. (2011) Enhancement of proton conductance by mutations of the selectivity filter of aquaporin-1. *J. Mol. Biol.*, 407, 607–620. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.01.036.
- Li Q. und Lancaster J.R. (2013) Chemical foundations of hydrogen sulfide biology. *Nitric Oxide*, 35, 21–34. DOI: 10.1016/j.niox.2013.07.001.
- Li Y., Xu D., Chen C., Li X., Jia R., Zhang D., Sand W., Wang F. und Gu T. (2018) Anaerobic microbiologically influenced corrosion mechanisms interpreted using bioenergetics and bioelectrochemistry: A review. *J. Mater. Sci. Technol.*, 34, 1713–1718. DOI: 10.1016/j.jmst.2018.02.023.
- Liao S.-M., Du Q.-S., Meng J.-Z., Pang Z.-W. und Huang R.-B. (2013) The multiple roles of histidine in protein interactions. *Chem. Cent. J.*, 7, 44. DOI: 10.1186/1752-153X-7-44.
- Liu G., Hinch B., Davatol-Hag H., Lu Y., Powers M. und Beavis A.D. (1996) Temperature dependence of the mitochondrial inner membrane anion channel. The relationship between temperature and inhibition by protons. *J. Biol. Chem.*, 271, 19717–19723. DOI: 10.1074/jbc.271.33.19717.
- Lü W., Du J., Schwarzer N.J., Gerbig-Smentek E., Einsle O. und Andrade S.L.A. (2012a) The formate channel FocA exports the products of mixed-acid fermentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109, 13254–13259. DOI: 10.1073/pnas.1204201109.
- Lü W., Du J., Schwarzer N.J., Wacker T., Andrade S.L.A. und Einsle O. (2013) The formate/nitrite transporter family of anion channels. *Biol. Chem.*, 394, 715–727. DOI: 10.1515/hsz-2012-0339.
- Lü W., Du J., Wacker T., Gerbig-Smentek E., Andrade S.L.A. und Einsle O. (2011) pH-dependent gating in a FocA formate channel. *Science (New York, N.Y.)*, 332, 352–354. DOI: 10.1126/science.1199098.
- Lü W., Schwarzer N.J., Du J., Gerbig-Smentek E., Andrade S.L.A. und Einsle O. (2012b) Structural and functional characterization of the nitrite channel NirC from *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109, 18395–18400. DOI: 10.1073/pnas.1210793109.
- Ludewig U., Wirén N. von und Frommer W.B. (2002) Uniport of NH₄⁺ by the root hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT1;1. *J. Biol. Chem.*, 277, 13548–13555. DOI: 10.1074/jbc.M200739200.
- Lv X., Liu H., Ke M. und Gong H. (2013) Exploring the pH-dependent substrate transport mechanism of FocA using molecular dynamics simulation. *Biophys. J.*, 105, 2714–2723. DOI: 10.1016/j.bpj.2013.11.006.
- Lyu M., Su C.-C., Kazura J.W. und Yu E.W. (2021) Structural basis of transport and inhibition of the *Plasmodium falciparum* transporter PfFNT. *EMBO Rep.*, 22, e51628. DOI: 10.15252/embr.202051628.
- Madshus I.H. (1988) Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. *Biochem. J.*, 250, 1–8. DOI: 10.1042/bj2500001.

Literatur

- Malik L. und Hedrich S. (2021) Ferric Iron Reduction in Extreme Acidophiles. *Front. Microbiol.*, 12, 818414. DOI: 10.3389/fmicb.2021.818414.
- Marini A.M., Soussi-Boudekou S., Vissers S. und Andre B. (1997) A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 17, 4282–4293. DOI: 10.1128/MCB.17.8.4282.
- Meier, A. L. (2020) Plasmodiale Formiat-Nitrit-Transporter: Biophysikalische Charakterisierung und Entwicklung eines phänotypischen Wirkstoff-Screenings. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Módis K., Ju Y., Ahmad A., Untereiner A.A., Altaany Z., Wu L., Szabo C. und Wang R. (2016) S-Sulfhydration of ATP synthase by hydrogen sulfide stimulates mitochondrial bioenergetics. *Pharmacol. Res.*, 113, 116–124. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.08.023.
- Mortimer C.E. und Müller U. (2019) Chemie: Das Basiswissen der Chemie. Thieme, Stuttgart.
- Mukherjee M., Gupta A. und Sankararamakrishnan R. (2020) Is the *E. coli* Homolog of the Formate/Nitrite Transporter Family an Anion Channel? A Computational Study. *Biophys. J.*, 118, 846–860. DOI: 10.1016/j.bpj.2019.12.024.
- Mukherjee M., Vajpai M. und Sankararamakrishnan R. (2017) Anion-selective Formate/nitrite transporters: Taxonomic distribution, phylogenetic analysis and subfamily-specific conservation pattern in prokaryotes. *BMC Genomics*, 18, 560. DOI: 10.1186/s12864-017-3947-4.
- Müller-Esterl W., unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kerscher, Stefan Kieß und Katrin Ridinger (2018) Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. Springer, Berlin Heidelberg.
- Mumberg D., Müller R. und Funk M. (1994) Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids. Res.*, 22, 5767–5768. DOI: 10.1093/nar/22.25.5767.
- Murata K., Mitsuoka K., Hirai T., Walz T., Agre P., Heymann J.B., Engel A. und Fujiyoshi Y. (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*, 407, 599–605. DOI: 10.1038/35036519.
- Murphy B., Bhattacharya R. und Mukherjee P. (2019) Hydrogen sulfide signaling in mitochondria and disease. *FASEB J.*, 33, 13098–13125. DOI: 10.1096/fj.201901304R.
- Nelson D.L. und Cox M.M. (2013) Lehninger principles of biochemistry. W.H. Freeman and Company, New York.
- Northrop D.B. (2001) Uses of isotope effects in the study of enzymes. *Methods (San Diego, CA, U. S.)*, 24, 117–124. DOI: 10.1006/meth.2001.1173.

- Olsson M.H.M., Søndergaard C.R., Rostkowski M. und Jensen J.H. (2011) PROPKA3: Consistent treatment of internal and surface residues in empirical pKa predictions. *J. Chem. Theory. Comput.*, 7, 525–537. DOI: 10.1021/ct100578z.
- Padan E. und Schuldiner S. (1987) Intracellular pH and membrane potential as regulators in the prokaryotic cell. *J. Membr. Biol.*, 95, 189–198. DOI: 10.1007/BF01869481.
- Peakman T., Crouzet J., Mayaux J.F., Busby S., Mohan S., Harborne N., Wootton J., Nicolson R. und 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. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb19125.x.
- Peng X., Wang N., Zhu A., Xu H., Li J., Zhou Y., Wang C., Xiao Q., Guo L., Liu F., Jia Z.-J., Duan H., Hu J., Yuan W., Geng J., Yan C., Jiang X. und Deng D. (2021) Structural characterization of the *Plasmodium falciparum* lactate transporter PfFNT alone and in complex with antimalarial compound MMV007839 reveals its inhibition mechanism. *PLoS Biol.*, 19, e3001386. DOI: 10.1371/journal.pbio.3001386.
- Petersen L.M. und Beitz E. (2020) The ionophores CCCP and gramicidin but Not nigericin inhibit *Trypanosoma brucei* aquaglyceroporins at neutral pH. *Cells*, 9. DOI: 10.3390/cells9102335.
- Petterson E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C. und Ferrin T.E. (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, 25, 1605–1612. DOI: 10.1002/jcc.20084.
- Pomès R. und Roux B. (1996) Structure and dynamics of a proton wire: a theoretical study of H⁺ translocation along the single-file water chain in the gramicidin A channel. *Biophys. J.*, 71, 19–39. DOI: 10.1016/S0006-3495(96)79211-1.
- Poznanski J., Szczesny P., Rusczyńska K., Zielenkiewicz P. und Paczek L. (2013) Proteins contribute insignificantly to the intrinsic buffering capacity of yeast cytoplasm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 430, 741–744. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.11.079.
- Putnam R.W. (2012) Intracellular pH Regulation. In: *Cell Physiology Source Book*, pp. 303–321. Elsevier, Elsevier.
- Rasband W.S. (1997-2018) ImageJ. URL <https://imagej.nih.gov/ij/> [zuletzt abgerufen am 27.Mai.2022].
- Rothert M., Rönfeldt D. und Beitz E. (2017) Electrostatic attraction of weak monoacid anions increases probability for protonation and passage through aquaporins. *J. Biol. Chem.*, 292, 9358–9364. DOI: 10.1074/jbc.M117.782516.

Literatur

- Ruprecht J.J., King M.S., Zögg T., Aleksandrova A.A., Pardon E., Crichton P.G., Steyaert J. & Kunji E.R.S. (2019) The Molecular Mechanism of Transport by the Mitochondrial ADP/ATP Carrier. *Cell*, 176, 435-447.e15. DOI: 10.1016/j.cell.2018.11.025.
- Rycovska A., Hatahet L., Fendler K. und Michel H. (2012) The nitrite transport protein NirC from *Salmonella typhimurium* is a nitrite/proton antiporter. *Biochim. Biophys. Acta*, 1818, 1342–1350. DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.02.004.
- Savage D.F., O'Connell J.D., Miercke L.J.W., Finer-Moore J. und Stroud R.M. (2010) Structural context shapes the aquaporin selectivity filter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107, 17164–17169. DOI: 10.1073/pnas.1009864107.
- Sawers R.G. (2006) Differential turnover of the multiple processed transcripts of the *Escherichia coli* *focA-pflB* operon. *Microbiology (Reading, U. K.)*, 152, 2197–2205. DOI: 10.1099/mic.0.28951-0.
- Schlegel H.G., Fuchs G. und Eitinger T. (2007) *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Schmidt J.D.R. (2018) Modulation der hydrophoben Konstriktionen entlang des Transportpfades von Formiat-Nitrit-Transportern. Masterarbeit, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Seick J.P. (2021) *In silico* Untersuchung von Inhibitoren des plasmodialen Lactat-Transporters. Masterarbeit, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Sievers F. und Higgins D.G. (2018) Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Sci.*, 27, 135–145. DOI: 10.1002/pro.3290.
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D. und Higgins D.G. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.*, 7, 539. DOI: 10.1038/msb.2011.75.
- Simon J. (2002) Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26, 285–309. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00616.x.
- Sui H., Han B.G., Lee J.K., Walian P. & Jap B.K. (2001) Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature*, 414, 872–878. DOI: 10.1038/414872a.
- Suppmann B. und 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. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00375.x.

- Tan K.P., Nguyen T.B., Patel S., Varadarajan R. und Madhusudhan M.S. (2013) Depth: A web server to compute depth, cavity sizes, detect potential small-molecule ligand-binding cavities and predict the pKa of ionizable residues in proteins. *Nucleic. Acids. Res.*, 41, W314-21. DOI: 10.1093/nar/gkt503.
- Tsukaguchi H., Shayakul C., Berger U.V., Mackenzie B., Devidas S., Guggino W.B., van Hoek A.N. und Hediger M.A. (1998) Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel. *J. Biol. Chem.*, 273, 24737–24743. DOI: 10.1074/jbc.273.38.24737.
- Tsukaguchi H., Weremowicz S., Morton C.C. und Hediger M.A. (1999) Functional and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9. *Am. J. Physiol.*, 277, F685-96. DOI: 10.1152/ajprenal.1999.277.5.F685.
- Urey H.C., Brickwedde F.G. und Murphy G.M. (1932) A Hydrogen Isotope of Mass 2. *Phys. Rev.*, 39, 164–165. DOI: 10.1103/PhysRev.39.164.
- Uzcátegui N.L., Szallies A., Pavlovic-Djuranovic S., Palmada M., Figarella K., Boehmer C., Lang F., Beitz E. und Duszenko M. (2004) Cloning, heterologous expression, and characterization of three aquaglyceroporins from *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.*, 279, 42669–42676. DOI: 10.1074/jbc.M404518200.
- Uzcátegui N.L., Figarella K., Segnini A., Marsiccobetre S., Lang F., Beitz E., Rodríguez-Acosta A. und Bertl A. (2018) *Trypanosoma brucei* aquaglyceroporins mediate the transport of metabolic end-products: Methylglyoxal, D-lactate, L-lactate and acetate. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 1860, 2252–2261. DOI: 10.1016/j.bbamem.2018.09.008.
- Volkov V. (2015) Quantitative description of ion transport via plasma membrane of yeast and small cells. *Front. Plant Sci.*, 6, 425. DOI: 10.3389/fpls.2015.00425.
- Waight A.B., Czyzewski B.K. und Wang D.-N. (2013) Ion selectivity and gating mechanisms of FNT channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 23, 499–506. DOI: 10.1016/j.sbi.2013.05.007.
- Waight A.B., Love J. und Wang D.-N. (2010) Structure and mechanism of a pentameric formate channel. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 17, 31–37. DOI: 10.1038/nsmb.1740.
- Wallace I.S., Choi W.-G. und Roberts D.M. (2006) The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1758, 1165–1175. DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.03.024.
- Walloch P. (2021) Charakterisierung und Inhibition humaner und plasmodialer Lactat-Transporter unter besonderer Berücksichtigung der Pentafluoro-3-hydroxy-pent-2-en-1-one. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

- Walloch P., Hansen C., Priegann T., Schade D. und Beitz E. (2021) Pentafluoro-3-hydroxy-pent-2-en-1-ones potently inhibit FNT-type lactate transporters from all five human-pathogenic *Plasmodium* species. *ChemMedChem*, 16, 1283–1289. DOI: 10.1002/cmdc.202000952.
- Walloch P., Henke B., Häuer S., Bergmann B., Spielmann T. und Beitz E. (2020) Introduction of scaffold nitrogen atoms renders inhibitors of the malarial l-lactate transporter, PfFNT, effective against the Gly107Ser resistance mutation. *J. Med. Chem.*, 63, 9731–9741. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c00852.
- Wambo T.O., Rodriguez R.A. und Chen L.Y. (2017) Computing osmotic permeabilities of aquaporins AQP4, AQP5, and GlpF from near-equilibrium simulations. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 1859, 1310–1316. DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.04.022.
- Wang Y., Huang Y., Wang J., Cheng C., Huang W., Lu P., Xu Y.-N., Wang P., Yan N. und Shi Y. (2009) Structure of the formate transporter FocA reveals a pentameric aquaporin-like channel. *Nature*, 462, 467–472. DOI: 10.1038/nature08610.
- White W.B. und Ferry J.G. (1992) Identification of formate dehydrogenase-specific mRNA species and nucleotide sequence of the *fdhC* gene of *Methanobacterium formicicum*. *J. Bacteriol.*, 174, 4997–5004. DOI: 10.1128/jb.174.15.4997-5004.1992.
- Wiechert M. und Beitz E. (2017a) Formate-nitrite transporters: Monoacids ride the dielectric slide. *Channels (Austin, Tex.)*, 11, 365–367. DOI: 10.1080/19336950.2017.1329999.
- Wiechert M. und Beitz E. (2017b) Mechanism of formate-nitrite transporters by dielectric shift of substrate acidity. *EMBO J.*, 36, 949–958. DOI: 10.15252/emj.201695776.
- Wiechert M., Eler H., Gollack A. und Beitz E. (2017) A widened substrate selectivity filter of eukaryotic formate-nitrite transporters enables high-level lactate conductance. *FEBS J.*, 284, 2663–2673. DOI: 10.1111/febs.14117.
- Wiechert M.I. (2017) Transportmechanismus und Selektivität der Formiat-Nitrit-Transporter. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität.
- Williams R. (2022) pKa values in water compilation. URL: https://organicchemistrydata.org/hansch/research/resources/pka/pka_data/pka-compilation-williams.pdf [zuletzt abgerufen am 20.Mai.2022].
- Wipf D., Benjdia M., Rikirsch E., Zimmermann S., Tegeder M. und Frommer W.B. (2003) An expression cDNA library for suppression cloning in yeast mutants, complementation of a yeast *his4* mutant, and EST analysis from the symbiotic basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum*. *Genome*, 46, 177–181. DOI: 10.1139/g02-121.

- Wree D., Wu B., Zeuthen T. und Beitz E. (2011) Requirement for asparagine in the aquaporin NPA sequence signature motifs for cation exclusion. *FEBS J.*, 278, 740–748. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07993.x.
- Wu B., Altmann K., Barzel I., Krehan S. und Beitz E. (2008) A yeast-based phenotypic screen for aquaporin inhibitors. *Pflugers. Arch.*, 456, 717–720. DOI: 10.1007/s00424-007-0383-3.
- Wu B., Rambow J., Bock S., Holm-Bertelsen J., Wiechert M., Soares A.B., Spielmann T. und Beitz E. (2015) Identity of a *Plasmodium* lactate/H(+) symporter structurally unrelated to human transporters. *Nat. Commun.*, 6, 6284. DOI: 10.1038/ncomms7284.
- Wu B., Steinbronn C., Alsterfjord M., Zeuthen T. und Beitz E. (2009) Concerted action of two cation filters in the aquaporin water channel. *EMBO J.*, 28, 2188–2194. DOI: 10.1038/emboj.2009.182.
- Yasui M., Hazama A., Kwon T.H., Nielsen S., Guggino W.B. und Agre P. (1999) Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. *Nature*, 402, 184–187. DOI: 10.1038/46045.
- Zeidel M.L., Ambudkar S.V., Smith B.L. und Agre P. (1992) Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein. *Biochemistry*, 31, 7436–7440. DOI: 10.1021/bi00148a002.
- Zheng L., Kostrewa D., Bernèche S., Winkler F.K. und Li X.-D. (2004) The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101, 17090–17095. DOI: 10.1073/pnas.0406475101.

6 | Anhang

6.1 Kalium-Passage durch EcFocA-Varianten nach Konstriktionserweiterung

Kalium-Medium		Spurenelemente		Vitamin-Lösung	
12 mM	L-Arginin	160 µM	H ₃ BO ₃	0,3 mM	Vit. B1
1 mM	MgCl ₂	4 µM	CuSO ₄	0,4 mM	Vit. B5
0,1 mM	CaCl ₂	13 µM	NaI	0,5 mM	Vit. B6
2 %	Glucose	16,5 µM	Na ₂ MoO ₄	0,6 µM	D-Biotin
5 %	Agar	49 µM	ZnSO ₄	sterilfiltrieren	
pH 5,5 einstellen (H ₃ PO ₄)		47,6 mM	Zitronensäure		
autoklavieren					
0,1 %	Spurenelemente	2,4 mM	MgSO ₄		
1 %	Vitamin-Lösung	18,5 mM	FeCl ₃		
0,1 %	L-Histidin	sterilfiltrieren			
0,1-2 mM	KCl				
vor dem Aushärten in Platten gießen					

Ein weiteres kationisches Substrat, welches auf Zugänglichkeit für leitfähige EcFocA-Varianten untersucht werden sollte, war Kalium. Die Methodik erfolgte analog den Methylamin-Assays phänotypisch (2.17). Hierzu wurde die Hefezelllinie CY162 Δ trk1-2, welche keine endogenen Kalium-Kanäle aufweist, mit den zu untersuchenden Konstrukten transformiert (2.9).

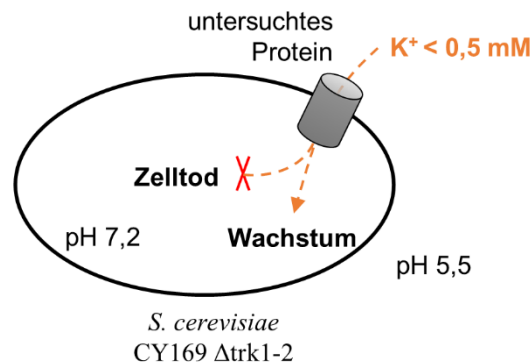


Abbildung 6-1: Schematische Darstellung des *Rescue*-Assays zur phänotypischen Beobachtung einer Passage von Kaliumionen durch untersuchte FNT-Varianten in der Hefe. Die zu verwendende Zelllinie CY162 Δ trk1-2 weist keine endogenen Kanäle für Kalium auf. Sind die heterolog exprimierten Proteine in der Lage Kalium zu leiten, gelangt dieses entlang des Konzentrationsgradienten in die Zellen. Bei niedrigen Kaliumkonzentrationen (unter 0,5 mM) ist dies essenziell für das Wachstum der Zellen.

Durch den *knock-out* des Trk1 und Trk2 können diese Hefen auf Kalium-Mangel-Medium nur wachsen, wenn durch ein heterolog exprimiertes Protein die Kalium-Aufnahme wiederhergestellt wird (Abbildung 6-1). Bei höheren

Kaliumkonzentrationen (> 0,5 mM) können Kaliumionen auch über unspezifische Ionenkanäle in Hefen gelangen (Anderson *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 2009).

***S. cerevisiae* CY162 Δ trk1-2**

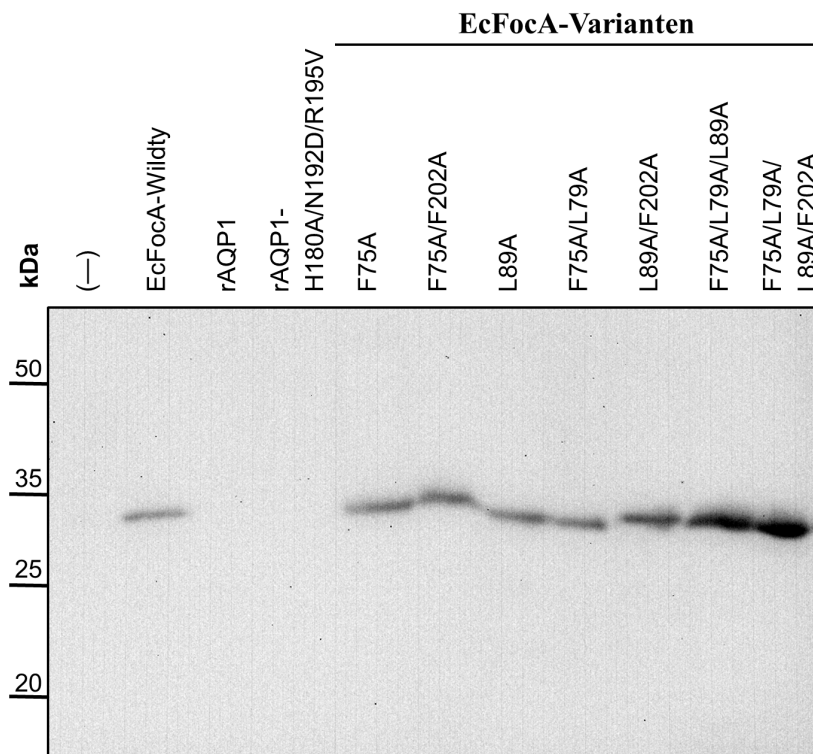


Abbildung 6-2: Expressionskontrolle von EcFocA-Varianten in *S. cerevisiae* CY162 Δ trk1-2. Die mikrosomale Fraktion eines Zellaufschlusses nach Transformation mit dem entsprechenden Konstrukt wurde mittels SDS-PAGE getrennt und mittels Western-Blot-Technik auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis erfolgte durch Anti-HA-Primärantikörper aus der Maus und HRP-Konjugierte-Anti-Maus-Sekundärantikörper. (-) zeigt den Aufschluss von Hefen, die mit Leerplasmid transformiert waren. Zudem wurden für Kontrollen Hefen mit dem Plasmid kodierend für rAQP1 und dessen Mutante H180A/N192D/R195V transformiert und entsprechend analysiert.

Die rAQP1-H180A/N192D/R195V-Mutante kann Kalium leiten und wurde als weitere Kontrolle eingesetzt (Wu *et al.*, 2009). Als nicht-leitende Kontrollen galten hier das orthodoxe, ionenausschließende AQP aus der Ratte (rAQP1) sowie Hefen, die mit Leerplasmid transformiert waren. Die Plasmide hierfür wurden von Dr. Christina Steinbronn generiert und in *E.-coli*-Dauerkulturen bereitgestellt. Die Kontrolle der Expression erfolgte mittels Western-Blot und zeigte, dass alle untersuchten EcFocA-Mutanten im verwendeten Hefestamm nachgewiesen werden konnten (Abbildung 6-2). Die rAQP1-Varianten wurden nicht detektiert. Da ihre Funktion jedoch bekannt und die Expression bereits nachgewiesen war (Wu *et al.*, 2009), wurde auf einen expliziten Nachweis verzichtet. Für die verwendete Zelllinie war bereits in SD-Kontrollmedium ein langsames Wachstum als für andere Zelllinien zu beobachten. So mussten zum erfolgreichen Anziehen der

Zellen als flüssige Vorkulturen zusätzliches Histidin, Lysin und Kalium zum Medium zugegeben werden (2.5).

Nach dem Übertragen auf festes Medium zeigten besonders Hefen, welche rAQP1-Varianten und Kreuz-Mutanten des EcFocA exprimierten, ab dem zweiten Verdünnungsschritt auf SD-Medium kaum Wachstum. Die anderen getesteten Zellen, die mit Leerplasmid oder Genen kodierend für EcFocA-Varianten transformiert waren, zeigten auf der SD-Kontrollplatte ein adäquates Wachstum (Abbildung 6-3). Diese Beobachtung auf SD-Kontroll-Medium zeigte sich auch auf allen getesteten Kalium-Selektionsmedien. Die auf SD-Medium sichtbar wachsenden Zellen zeigten stets größere Zellkolonien auf den Selektionsplatten. Erst ab einer Kaliumkonzentration von 1 mM zeigte die rAQP1-H180A/N192D/R195V-Mutante ein besseres Wachstum als der entsprechende Wildtyp.

Dies entsprach nicht den Erwartungen, die dieser Mutante ein deutlich besseres Wachstum selbst bei niedrigen Kaliumkonzentrationen zusagten (Wu *et al.*, 2009). Zwischen dem EcFocA-Wildtyp und den in je nur einer Konstriktion erweiterten Mutanten (F75A, L89A, F75A/F202A) konnte kein Unterschied festgestellt werden. Sie wuchsen jedoch wider Erwarten auch auf Kaliummangelmedium von 0,1 mM. Die EcFocA-Kreuz-Mutanten exprimierenden Hefen wuchsen analog dem rAQP1 schwächer, jedoch war die Fitness dieser Zellen bereits auf SD-Medium schlechter zu bewerten. Damit konnte der Kalium-Assay nicht ausreichend etabliert werden, um stichhaltige Schlüsse über die Kaliumpassage durch konstriktionserweiterte EcFocA-Mutanten zu treffen. Der Assay sollte mit der Verwendung einer Kontrolle, welche schneller Kalium leitet, z.B. dem *Arabidopsis thaliana* Kalium-Kanal AtKAT1 (Anderson *et al.*, 1992), wiederholt werden und die Expression der Kontrollen z.B. durch Verwendung eines rAQP1-spezifischen Antikörpers sichergestellt werden.

Anhang

Kalium-Passage durch EcFocA-Varianten nach Konstriktionserweiterung

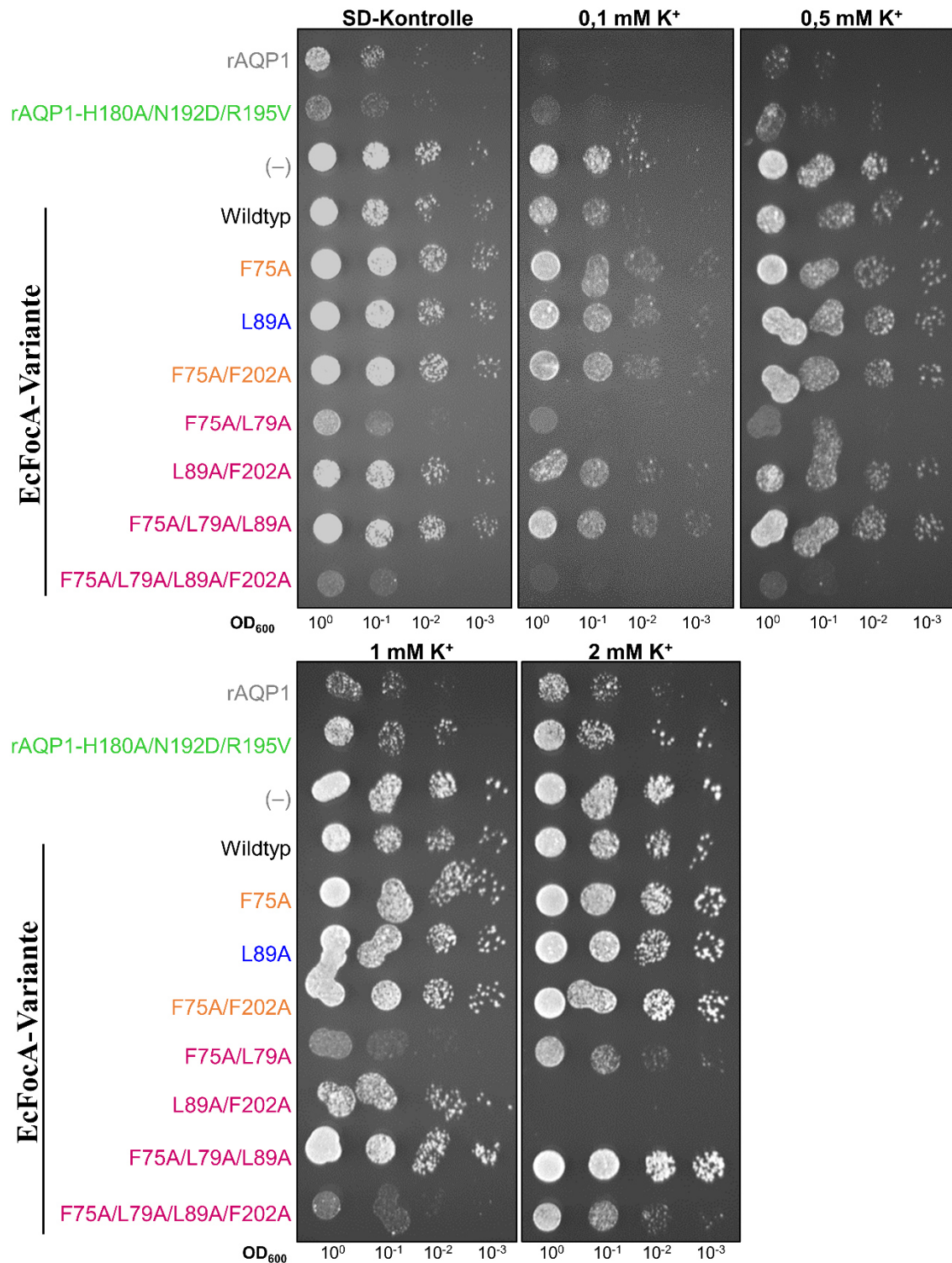


Abbildung 6-3: Serielle Verdünnung von Hefesuspensionen auf festem SD-Kontroll-Medium (oben links) und Kalium-Medium (0,1, 0,5, 1 und 2 mM) für den phänotypischen Assay zur Passage von Kalium durch EcFocA-Varianten nach Eröffnung der Konstriktionen (exoplasmatisch: F75A, F75AF202A (orange); zytoplasmatisch: L89A (blau); Kreuz: F75A/L79A, L89A/F202A, F75A/L79A/L89A, F75A/L79A/L89A/F202A (pink)) sowie Hefen, die mit Leerplasmid transformiert waren (–) und rAQP1 (grau) und rAQP1-H180A/N192D/R195V, das Kalium leiten kann (grün). Einfache Durchführung des Experimentes gezeigt, mit N = 2 bestätigt.

6.2 Ammonium-Passage durch EcFocA-Varianten nach Konstriktionserweiterung

Ammonium-Medium

Lösung 1	Lösung 2
0,17 % (w/w) YNB	4 mM Ammoniumsulfat
3 % (w/w) Glucose	40 mM MOPS
pH 7,5 einstellen (NaOH)	pH 7,5 einstellen (NaOH)
sterilfiltrieren	4,2 % Agar
temperieren auf 50 °C	autoklavieren
Lösung 1 und 2 1:1 mischen und vor dem Aushärten in Platten gießen.	

Ein weiteres kationisches Substrat, das zur Prüfung der Passage positiv geladener Teilchen nach Konstriktionserweiterung herangezogen wurde, war das Ammonium. Die Methodik erfolgte analog den Methylamin-Assays (2.17). Dazu wurde ein phänotypischer Assay auf Mangelmedium durchgeführt, bei dem Ammonium als einzige Stickstoffquelle diente. Nur Hefen, die einen Kanal exprimieren, welcher Ammonium in die Zellen befördert, können auf dem Selektionsmedium wachsen (*Rescue-Assay*, Abbildung 6-4).

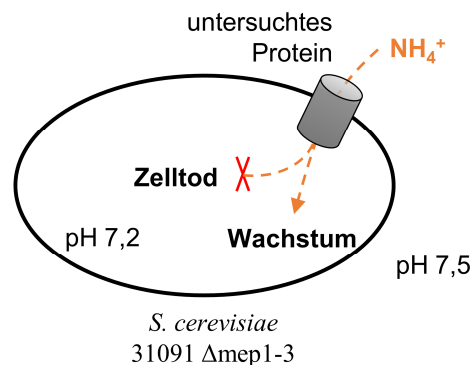


Abbildung 6-4: Schematische Darstellung des *Rescue-Assays* zur phänotypischen Beobachtung einer Passage von Ammonium durch untersuchte FNT-Varianten in der Hefe. Die zu verwendende Zelllinie 31901b Δmep1-3 weist keine endogenen Kanäle für Ammonium und kleine neutrale Solute auf. Sind die heterolog exprimierten Proteine in der Lage Ammonium zu leiten, gelangt dieses entlang des Konzentrationsgradienten in die Zellen. Da sonst keine andere Stickstoffquelle zur Verfügung gestellt wird, können nur solche Zellen auf dem Medium wachsen.

Hierzu wurde erneut der Hefestamm 31091b Δmep1-3 verwendet, bei dem die Gene für die endogenen Ammoniumtransporter deletiert sind und die Expression der getesteten Konstrukte bekannt war (Abbildung 3-44). Hefen, die mit dem Gen kodierend für den Ammoniumtransporter aus der Tomate, LeAMT1;1, transformiert waren, sollten Ammonium aufnehmen können und sollten demnach deutlich wachsen (Ludewig *et al.*, 2002). Hefen, die mit Leerplasmid transformiert waren, sollten kein Wachstum zeigen.

Anhang

Ammonium-Passage durch EcFocA-Varianten nach Konstriktionserweiterung

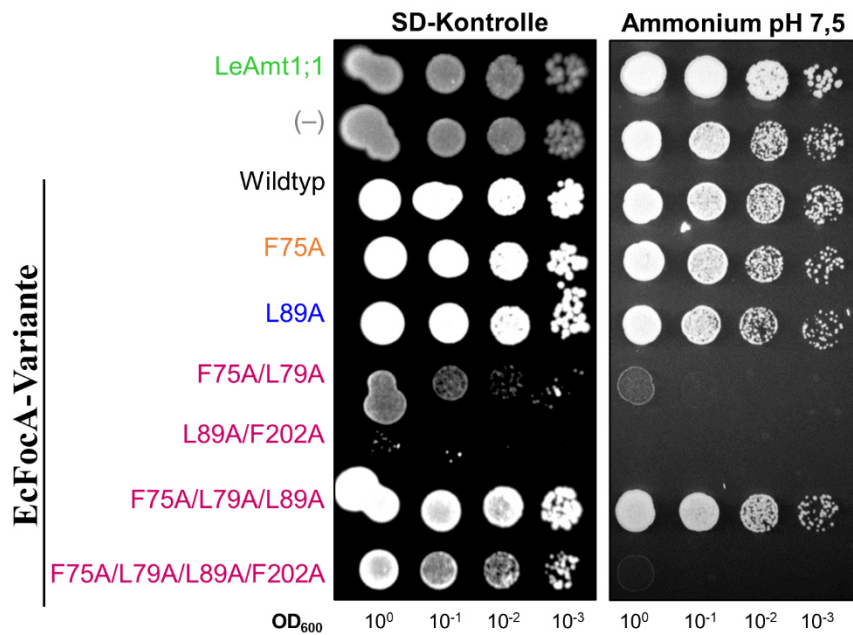


Abbildung 6-5: Serielle Verdünnung von Hefesuspensionen auf festem SD-Kontroll-Medium (links) und Ammonium-Medium (2 mM, pH 7,5, rechts) für den phänotypischen Assay zur Passage von Ammonium von EcFocA-Varianten nach Eröffnung der Konstriktionen (exoplasmatisch: F75A (orange); zytoplasmatisch: L89A (blau); Kreuz: F75A/L79A, L89A/F202A, F75A/L79A/L89A, F75A/L79A/L89A/F202A (pink)) sowie der Hefen die mit Leerplasmid transformiert waren (-) (grau) und LeAMT1;1 (grün). Die einfache Durchführung des Experimentes ist gezeigt und wurde mit N = 2 bestätigt.

Hefen die das LeAMT1;1 exprimierten zeigten auf dem Selektionsagar mit 2 mM Ammonium bei pH 7,5 entsprechend den Erwartungen das deutlichste, stärkste Zellwachstum und somit die Passage von Ammoniumionen an. Allerdings zeigten auch andere getestete Kulturen, etwa Hefen die kein Protein heterolog exprimierten oder Hefen, die den EcFocA-Wildtyp exprimierten, ein adäquates Wachstum auf dem Selektionsagar (Abbildung 6-5). Zwar waren die Kolonien dieser Kulturen nicht so dicht gewachsen, jedoch waren sie selbst bei 1000-facher Verdünnung noch eindeutig auszumachen, obwohl eine Ammoniumpassage durch die exprimierten Konstrukte ausgeschlossen werden konnte. Auch die Einfachmutanten EcFocA-F75A und -L89A zeigten dieses Verhalten. Hefen die EcFocA Kreuz-Mutanten oder das TbAQP2 exprimierten, wuchsen im Vergleich nur schwach auf dem Selektionsagar. Allerdings wuchsen hier auch die Kontrollen auf SD-Medium langsamer (Abbildung 6-5). So war im Assay nicht eindeutig zwischen Aufnahme von Ammonium und einem Ausbleiben dessen zu unterscheiden und es konnte keine endgültige Aussage zur Ammoniumpassage der untersuchten EcFocA-Varianten getroffen werden. Sie sollten mit einer Kontrolle wiederholt werden, bei der die Expression eindeutig nachgewiesen ist.

Eidesstattliche Erklärung

Diese Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und, abgesehen von der Beratung durch den Betreuer, nur mit den hier angegebenen Quellen und Hilfsmitteln verfasst habe. Ich versichere auch, dass mir noch kein akademischer Grad entzogen wurde. Diese Arbeit wurde noch in keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Publikationen:

Geistlinger K., Schmidt J.D.R. und Beitz E. (2022) Lactic Acid Permeability of Aquaporin-9 Enables Cytoplasmic Lactate Accumulation via an Ion Trap. *Life*, 12. DOI: 10.3390/life12010120.

Schmidt J.D.R. und Beitz E. (2022) Mutational widening of constrictions in a formate-nitrite/H⁺ transporter enables aquaporin-like water permeability and proton conductance. *J. Biol. Chem.*, 298, 101513. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.101513.

Schmidt J.D.R., Walloch P., Höger B. und Beitz E. (2021) Aquaporins with lactate/lactic acid permeability at physiological pH conditions. *Biochimie*, 188, 7–11. DOI: 10.1016/j.biochi.2021.01.018.

Posterbeitrag:

Exploring the role of the constriction sites and the central histidine in Formate-Nitrite-Transporters. *Transporter and Barrier Meeting Bad Herrenalb 2019*, Bad Herrenalb, Germany.

Jana Dorothea Renate Schmidt

Kiel, im August 2022

Danksagung

Eine Doktorarbeit ist keine leichte Aufgabe und ohne Unterstützung kaum zu schaffen. Ich möchte mich aufrichtig bei allen, die mir die Zeit erleichtert haben, bedanken.

Ich danke meinem Betreuer, Eric Beitz, für die lockeren Zügel, die Du im richtigen Moment gespannt hast. Ich bedanke mich bei den treuen und zuverlässigen Seelen des Hauses: Uli (vergiss die Scheuklappen nicht!), Kalle, Dirk, Susanne und Britta. Bei Björn, Susan und vielen HiWis für die technische Mitarbeit. Bei Herr Dr. Gelhaus für die zuverlässige Unterstützung im Strahlenschutz. Ich danke dem Institut für Klinische Molekular Biologie Kiel für die Durchführung der Sanger Sequenzierung, die durch das DFG *cluster "Precision Medicine in Chronic Inflammation"* und *"ROOTS"* gefördert wird. Ich danke T. Naujoks, Dr. D. Langfeldt und Dr. B. Löscher für die technische Unterstützung dabei.

Ich bedanke mich bei allen Vorgänger*innen die mich so herzlich aufgenommen und eingearbeitet haben: Philipp H., Malte, Folknand, Holger, Katha J. und Anna M. Ein riesen Dank gilt auch Anna Fuchs für so viel handwerkliche Unterstützung im Labor und die aufrichtigen Gespräche dabei. Ich danke dem Partyarbeitskreis 2.0 der das tägliche Arbeiten hier so bereichert hat: Anna K., PWA, Nathan, Christian, Moira, Cornelius und Timo. Danke, dass wir einander immer den Rücken freigehalten haben, das Isotopenlabor fair geteilt wurde und natürlich für das Ditschen und die Teestunden.

Ein riesen großer Dank gilt Basti, für den Präsenz-Bruder-Ersatz. Danke fürs Zuhören, für deinen *gossip* und deine Ehrlichkeit. Ein genauso großer Dank gilt Katha G.: Du bist mir ein so großes Vorbild mit deinem Durchhaltevermögen und deinem Forscherinnengeist! Danke fürs Motivieren, Erklären und unseren Büro-Spirit. Danke genauso sehr an Lea, fürs Beraten, Vormachen, dass man es schafft, akribische Korrekturen und die vielen Musicalfachgespräche.

Ich danke dem Soziraum und allen Insassen für die Mittags- und Kaffeepausen, das Spikeball, den Dänemarkurlaub, die Grillabende, die Grünkohlfestspiele, viele Partys und fachliche Diskussionen. Einen dicken Dank besonders an: meinen König Stefan, unserem Quizmaster Patrick, Theo meinem Demo-Buddy, dem

Danksagung

immer hilfsbereiten Karsten, Till für die Lacher, Sven für die *dance breaks* und Ole für die unzähligen Besuche im Labor und die vertrauten Gespräche.

Ich danke dem Wiss-Komm-Team Kiel, vor allem Mr. Science, Mrs. Show und dem *Pint-of-Science*-Team Kiel. Ein riesen großer Danke gilt dem TeKielas Ultimate Frisbee Team Kiel e.V. für unzählige Trainings die mir den Kopf freigemacht haben. Dafür danke ich auch allen Kunstschaftenden, die mich durch die Corona-Zeit getragen haben. Allen voran meiner Gesangslehrerin Steffi Regner; nirgends konnte ich meine Akkus so gut aufladen wie beim Singen und das Üben im Isotopenlabor hat mir den Arbeitsalltag sehr bereichert.

Ich danke meinen besten Freundinnen Anni und Mena: nicht nur auf, sondern vor allem neben dem Frisbee-Feld seid ihr mein Aufbau: ohne euch wäre das hier mental nicht zu leisten gewesen. Ich weiß, ich kann immer auf euch zählen. Ich bin so froh euch an meiner Seite gehabt zu haben. Danke fürs Zuhören, fürs zusammen Lachen, fürs mich so nehmen wie ich bin. Mena ganz besonders für unsere *big-spender* Trips und Anni für die Wrap-Abende mit so verständnisvollen Gesprächen.

Zum Schluss danke ich von Herzen meiner Familie (und allen, die sich dazu zählen!), die mir stets gezeigt hat, dass ich stolz auf mich sein kann, und dass ich so wie ich bin geliebt werde. Dafür bedanke ich mich besonders bei meiner Patentante Heike, den Walzens und Oma Kiel und widme meine Arbeit Oma und Opa Lübeck. Einen extra Dank an Mama und Papa für eure Zuversicht in mich. Aber mein aller aller größter Dank gilt meinem Bruder Dennis. Für die unzählbaren Anrufe, jedes ernstgemeinte „wie geht's?“, fürs aufrichtige Zuhören und den vielen Quatsch. Das hat jedes Mal so gutgetan. Ich habe euch alle so lieb!