

**Klassischer Ionen-Kanal oder Transporter? -
Mechanistische Studien zeigen das Hybrid-Verhalten des
Formiat-Kanals FocA**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Michelle Kammel

Geb. 09.05.1993 in Torgau

Gutachter:

1. Prof. Dr. Gary Sawers
2. PD Dr. Ralph Golbik
3. Prof. Dr. Johann Heider

Halle, Saale den 22.02.2023

<< Theorien sind nie mehr als kühne Vermutungen und Hypothesen, von uns gemachte Netze, mit denen wir die wirkliche Welt einzufangen versuchen. >>

Karl Raimund Popper

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis.....	6
Abkürzungsverzeichnis.....	7
1 Einleitung.....	8
1.1 Stoffwechsel in <i>E. coli</i>	9
1.1.1 Gemischte Säuregärung.....	10
1.2 Formiat-Metabolismus.....	11
1.2.1 Pyruvat Formiat-Lyase.....	13
1.2.1 Weitere Komponenten des Formiat-Stoffwechsels.....	15
1.3 Der Formiat-Kanal FocA als Vertreter der FNTs.....	18
1.3.1 Familie der FNTs.....	18
1.3.2 Struktur des FNT-Protomers am Beispiel von FocA.....	22
1.3.3 Translokationsmechanismus der FNTs.....	25
1.4 Methoden zur Analyse der Formiat-Translokation.....	27
2 Zielstellung.....	30
<hr/>	
Kumulativer Abschnitt	
Kapitel 1 – Einfluss der <i>N</i> -terminalen FocA Domäne auf die Formiat-Translokation.....	31
I) The soluble cytoplasmic <i>N</i> -terminal domain of the FocA channel gates bidirectional formate translocation – <i>Molecular Microbiology</i> 2021	
Kapitel 2 – Einfluss des zentralen H209 auf die Formiat-Translokationsaktivität.....	46
II) A single amino acid exchange converts FocA into a unidirectional efflux channel for formate – <i>Microbiology</i> 2022	
Kapitel 3 – Bedeutung der Interaktion von T91 und H209 in FocA.....	63
III) Interplay between the conserved pore residues Thr-91 and His-209 controls formate translocation through the FocA channel – <i>Microbial Physiology</i> 2022	
<hr/>	
3 Diskussion.....	77
3.1 FocAs besondere Funktion im Formiat-Regulon.....	77
3.1.1 FocAs <i>N</i> -Terminus und die Wechselwirkung mit PflB.....	77
3.1.2 Methoden zur <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Charakterisierung der FNT-Translokationsaktivität.....	79
3.1.3 Spezifität der FNTs zu ihren translozierenden Ionen.....	81
3.1.4 FocA und die Wechselwirkung mit dem FHL-Komplex.....	82
3.1.5 Modell des Zusammenspiels aller Komponenten des anaeroben Formiat-Stoffwechsels.....	84

3.2	Die Bedeutung von konservierten Aminosäuren in der Translokationspore von <i>E. coli</i> FocA.....	85
3.2.1	Die Funktion des zentralen Histidins (H209).....	85
3.2.2	Mechanistische Bedeutung von T91 und die Interaktion mit H209.....	88
3.2.3	Weitere konservierte Aminosäuren und deren potentielle Funktion.....	90
3.3	Translokationsmechanismen von FocA als Vertreter der FNT-Familie.....	92
3.3.1	Translokationsmechanismen von Ionen-Kanälen und anderen strukturell ähnlichen Proteinen.....	92
3.3.2	Konformationen der Ω -Schleife von FNTs.....	93
3.3.3	Direktionalität der Translokation von FNTs.....	95
3.3.4	Hypothetische Mechanismen der Translokation in <i>E. coli</i> FocA.....	96
3.3.5	Ist FocA ein „Ionen-Kanal-Transporter-Hybrid“?.....	100
3.4	Bedeutung der FNT-Forschung und Ausblick.....	101
4	Zusammenfassung.....	105
5	Literaturverzeichnis.....	106
6	Anhang.....	114
7	Danksagung.....	124
8	Darlegung des Eigenanteils an den Publikationen	126
9	Publikationsverzeichnis.....	127
10	Eidesstattliche Erklärung.....	128

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Reaktionen der gemischten Säuregärung.....	10
Abbildung 2:	Bilanz der gemischten Säuregärung in <i>E. coli</i>	11
Abbildung 3:	Übersicht der wichtigsten Komponenten des Formiat-Stoffwechsels.....	11
Abbildung 4:	Reaktion der Pyruvat Formiat-Lyase.....	13
Abbildung 5:	Reaktionsmechanismus der Pyruvat Formiat-Lyase.....	15
Abbildung 6:	Sequenzvergleich der N-terminalen Bereiche verschiedener FNTs.....	21
Abbildung 7:	Struktur des <i>E. coli</i> Formiat-Kanals FocA.....	22
Abbildung 8:	Sekundärstrukturelemente des <i>E. coli</i> Formiat-Kanals FocA.....	23
Abbildung 9:	Konformationen der Ω -Schlaufe in <i>Vibrio cholerae</i> FocA	24
Abbildung 10:	Postulierte Translokationsmechanismen der FNTs.....	26
Abbildung 11:	Methoden zur Analyse der Formiat-Translokation.....	28
Abbildung 12:	Modell der Wechselwirkung der Proteine des anaeroben <i>E. coli</i> Formiat- Metabolismus.....	84
Abbildung 13:	Hypothetisches Modell Kanal-artigen Formiat-Translokation <i>via</i> FocA.....	97
Abbildung 14:	Hypothetisches Modell der Formiat-Aufnahme mittels sekundär aktivem Transport <i>via</i> FocA.....	99
Abbildung A1:	Vorkommen der Gene <i>focA</i> , <i>pflB</i> und <i>pflA</i> in allen Domänen.....	115
Abbildung A2:	Genomische Organisation von <i>focA</i> , <i>pflB</i> und <i>pflA</i> in Bakterien.....	116
Abbildung A3:	Konservierte Aminosäuren in FNTs	117
Abbildung A4:	Formiat-Profile im <i>E. coli</i> Parentalstamm und einer <i>focA</i> -Mutante.....	118
Abbildung A5:	Strukturelle Unterschiede der FNTs in Bezug auf TM2 und die Ω -Schlaufe.....	119
Abbildung A6:	Proteinsequenzen von <i>E. coli</i> FocA und PflB	120
Abbildung A7:	Identifizierte Aminosäure-Seitenketten der Vernetzung von <i>E. coli</i> FocA und PflB...	122
Abbildung A8:	Einfluss der N-terminalen Aminosäuren von FocA auf die Formiat-Translokation.....	123

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Proteine des anaeroben <i>E. coli</i> Formiat-Stoffwechsels.....	12
Tabelle 2:	Translokationsaktivitäten verschiedener T91 und H209-FocA-Varianten	86
Tabelle A1:	In der Doktorarbeit verwendete Stämme.....	114
Tabelle A2:	Wachstumsdefizit von DH4200 (FocA _{H209N}) in Abhängigkeit vom Kulturmedium.....	114
Tabelle A3:	Zusammenfassung der Vernetzungen von <i>E. coli</i> FocA und PfIB.....	121

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström (Einheit)	Hyd-3	Hydrogenase-3
ArcA	Aerobe Atmung kontrollierendes Protein	M9-Medium	Verwendetes Minimalmedium
ATP	Adenosintriphosphat	<i>M. formicicum</i>	<i>Methanobacterium formicicum</i>
<i>C. difficile</i> oder <i>Cd</i>	<i>Clostridioides difficile</i>	MS	Massenspektrometrie
CoA	Coenzym A	NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid bzw. reduzierte Form NADH
CIC	Familie der Chlorid Kanäle	NirC	Nitrit-Transporter, benannt nach dem Gen des Operons
Cryo-EM	Cryo-Elektronenmikroskopie	N-Terminus	Amino-Terminus
C-Terminus	Carboxy-Terminus	OD ₆₀₀	Optische Dichte
Da	Dalton (Einheit)	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DDM	<i>n</i> -Dodecyl-β-D-Maltosid	PDB	Proteindatenbank
DMSO	Dimethylsulfoxid	<i>P. falciparum</i> oder <i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PflA	Pyruvat Formiat-Lyase aktivierendes Protein
<i>E. coli</i> oder <i>Ec</i>	<i>Escherichia coli</i>	PflB	Pyruvat Formiat-Lyase
FDH	Formiatdehydrogenase	P _i	Anorganisches Phosphat
FdhC	Formiat-Kanal, benannt nach Gen des Operons	pK _s	Säurekonstante
FHL	Formiat-Hydrogenlyase	<i>pmf</i>	Elektrochemischer Protonengradient (<i>proton motive force</i>)
FHL-A	Formiat-Hydrogenlyase aktivierendes Protein	PNPG	<i>p</i> -Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
FNR	Fumarat- und Nitratreduktion-Regulator	RMSD	Abweichung des quadratischen Mittels (in Bezug auf Atompositionen)
FNT	Formiat-Nitrit-Transporter	SAM	S-Adenosyl-Methionin
FocA	<i>formate channel A</i> ; Formiat-Kanal A	<i>SI</i>	<i>Supplementary Information</i> (Anhang der Publikationen)
FocB	<i>formate channel B</i> Formiat-Kanal B	TM	Transmembrane Helix
GRE	Glycylradikal-Enzyme	RMSD	Abweichung des quadratischen Mittels (in Bezug auf Atompositionen)
HSC	<i>hydrosulfide channel</i> , Hdyrosulfid-Kanal	SAM	S-Adenosyl-Methionin
H ⁺	Proton	<i>S. enterica</i> oder <i>St</i>	<i>Salmonella enterica ser. Typhimurium</i>
HCOO ⁻ /HCOOH	Formiat/Ameisensäure	<i>V. cholerae</i> oder <i>Vc</i>	<i>Vibrio cholera</i>

Die Aminosäuren werden in der Regel im Einbuchstabencode nach IUPAC angegeben

1 Einleitung

Mikroorganismen bestehen, gemessen an ihrem Trockengewicht, zu 70-85 % aus Wasser und zu ca. 50 % aus Proteinen (Madigan *et al.*, 2001). Die Zellwand bzw. -membran begrenzt die Zellen bzw. deren Kompartimente und sorgt sowohl für mechanischen Schutz als auch osmotische Stabilität. Die Lipiddoppelschicht, welche erstmals 1925 von E. Gorter und F. Grendel beschrieben wurde, ist der Grundbaustein von Zellmembranen. Die Lipidmoleküle weisen einen amphiphilen Charakter auf und allgemein sind die Membranen semipermeabel, das heißt, dass Wasser und andere kleine ungeladene Moleküle diese durch Diffusion passieren können. In Bezug auf viele polare oder größere Moleküle ist sie hingegen nahezu undurchlässig. Eine präzise Kontrolle des Transfers von Ionen und anderen Molekülen über diese biologischen Membranen ist essentiell, da so der Stoffwechsel; u.a. das pH-, Energie- oder Redoxgleichgewicht reguliert werden kann (Madigan *et al.*, 2001). Der kontrollierte Transport der Moleküle wird durch ubiquitär vorkommende integrale Membranproteine gewährleistet und die Frage, nach den zugrundeliegenden Mechanismen, ist seit Jahrzehnten ein wichtiges Forschungsthema.

Im Jahr 2003 wurde der Chemie-Nobelpreis für die Entdeckung von Kanälen in Zellmembranen an P. Agre (Johns Hopkins Universität, Baltimore, USA), der erstmals einen, als Aquaporin bezeichneten, Wasserkanal identifizierte und an R. MacKinnon (Howard Hughes Medizinische Institut, Rockefeller University, New York, USA) für die strukturellen und mechanistischen Studien an Ionen-Kanälen verliehen (Preston *et al.*, 1992; Doyle *et al.*, 1998). Dem stetigen Fortschritt in der Röntgenkristallographie seit den 1960er Jahren ist es zu verdanken, dass die Arbeitsgruppe um R. MacKinnon die atomare Struktur des Kalium-Kanals KcsA auflöste (Doyle *et al.*, 1998). Außerdem ermöglicht die Strukturauflösung auch heute ein besseres Verständnis der Transportproteine, besonders in Bezug darauf, dass gleichzeitig hohe Selektivität und Transportgeschwindigkeit erreicht werden können.

Allgemein können Transportproteine in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden: Ionen-Kanäle und sekundär aktive Transporter bzw. Ionen-Pumpen. In den Poren von Kanälen werden Ionen, wenn sich diese im „geöffneten“ Zustand bzw. Konformation befinden, entlang des Konzentrationsgradienten passiv durch Diffusion mit sehr hoher Rate transportiert. Die Öffnung des Kanals kann auf unterschiedliche Weise gesteuert werden, beispielsweise durch Licht, thermische, mechanische oder elektrische Änderungen oder durch chemische Komponenten wie das Binden von Liganden. Beim aktiven Transport hingegen können Ionen sowohl entlang als auch entgegen ihres elektrochemischen Potentials transportiert werden, was durch die Kopplung von energieliefernden Reaktionen wie der Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) oder im Symport bzw. Antiport mit einem anderen Ion gewährleistet wird. In der Regel geschieht dies durch enzymartige Reaktionsmechanismen und bedarf einer umfassenderen Konformationsänderung des Proteinrückgrates. Die Transportraten sind im Vergleich zu Kanälen einige Größenordnungen ($10^3 - 10^6$ -fach) geringer (Berg *et al.*, 2012).

Trotz der engen genetischen Verwandtschaft, gibt es viele mechanistische Unterschiede zwischen den Klassen der Translokatoren und viele Proteine lassen sich nicht eindeutig zuordnen. Dies zeigt sich beispielsweise bei der CIC-Familie der Chlorid-Kanäle (*chloride channels*), bei denen einige Vertreter zu Kanalproteinen, aber andere zu Chlorid/Protonen-Transportern, zählen (Miller, 2006). Gemeinsam

ist jedoch den meisten Transportproteinen, dass der spezifischen Translokation des jeweiligen Moleküls ein sehr raffinierter, oft durch mehrere Kontrollinstanzen regulierter Mechanismus, zu Grunde liegt.

Eine eindeutige Klassifizierung konnte auch nicht für den im Fokus dieser Arbeit stehenden Formiat-Kanal FocA (*formate channel A*) vorgenommen werden (Suppmann und Sawers, 1994). Diese Frage wird durch Analysen des *Escherichia coli* (*E. coli*) Proteins adressiert. Zunächst soll der Stoffwechsel dieses Mikroorganismus erläutert werden, um so die Bedeutung von FocA verstehen zu können.

1.1 Energiestoffwechsel von *E. coli*

E. coli, dessen Formiat-Stoffwechsel im Zentrum dieser Arbeit steht, wird seit Jahrzehnten als Modellorganismus in der medizinischen, biologischen und biotechnologischen Forschung verwendet. Seine kurze Generationszeit, unkomplizierte Kultivierung und die leichte genetische Zugänglichkeit tragen dazu bei, dass bereits viele zelluläre Prozesse intensiv untersucht wurden. Obwohl das Bakterium der genetisch und molekularbiologisch am besten untersuchte Organismus ist, sind viele Stoffwechselprozesse und deren Regulation nicht oder nur teilweise aufgeklärt (Madigan *et al.*, 2001).

E. coli ist ein gramnegatives, stäbchenförmiges, vor allem im Darm von Menschen und Tieren vorkommendes, peritrich begeißeltes γ -Proteobakterium, welches zur Familie der Enterobakterien gehört (Madigan *et al.*, 2001). Es zählt zu den fakultativen Anaerobiern und kann daher Energie sowohl durch aerobe und anaerobe Atmung, als auch durch die gemischte Säuregärung konservieren. Die Art der Energiekonservierung hängt davon ab, welche Substrate als Elektronenakzeptoren vorhanden sind und wird durch den Fumarat/Nitrit Regulator (FNR) und den Transkriptionsregulator ArcA bestimmt (Sawers und Suppmann, 1992). Der heterotrophe Mikroorganismus kann dabei u. a. Fruktose, Acetat, Pyruvat, Fumarat oder Glycerol als Kohlenstoffquelle nutzen. Die bevorzugte Kohlenstoff- und Energiequelle ist jedoch Glukose. Diese wird in die Zelle über das Phosphotransferase System (PTS) aufgenommen und dabei gleichzeitig phosphoryliert (Kundig *et al.*, 1964). Das resultierende Glukose-6-phosphat wird in der Glykolyse, welche sowohl in An- und Abwesenheit von Sauerstoff stattfindet, über Substratkettenphosphorylierung in zwei Moleküle Pyruvat umgewandelt. Bei diesen Reaktionen entstehen außerdem zwei Reduktionsäquivalente Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) und zwei Adenosintriphosphate (ATP). In Anwesenheit von Sauerstoff wandelt der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex Pyruvat zu Kohlenstoffdioxid und Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) um, welches im Citratzyklus zu CO₂, CoA, Reduktionsäquivalenten und Guanosintriphosphat (GTP) umgesetzt wird. So entstehen insgesamt pro Glukose zwei ATP, zwei GTP, zehn NADH+H⁺ und zwei FADH₂. In der oxidativen Atmung werden die Elektronen der Reduktionsäquivalente über eine Reihe von membranständigen Enzymkomplexen auf den terminalen Elektronenakzeptor Sauerstoff übertragen. Dabei wird ein elektrochemischer Protonengradient (*proton motive force*) aufgebaut und die ATP-Synthase kann Energie in Form von ATP speichern. Insgesamt werden bei der vollständigen Oxidation von Glukose bis zu 32 Moleküle ATP generiert (Berg *et al.*, 2012). Auch unter anoxischen Bedingungen kann, wenn auch mit deutlich geringerer Energieausbeute, Respiration stattfinden. Dabei können Nitrat, Fumarat, Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Trimethylaminoxid (TMAO) als Elektronenakzeptoren genutzt werden (Ingledew und Poole, 1984). Sind diese Elektronenakzeptoren nicht vorhanden, wird in *E. coli* Energie durch die gemischte Säuregärung konserviert.

1.1.1 Gemischte Säuregärung

Eine Übersicht aller Reaktionen der gemischten Säuregärung ist in Abbildung 1 dargestellt.

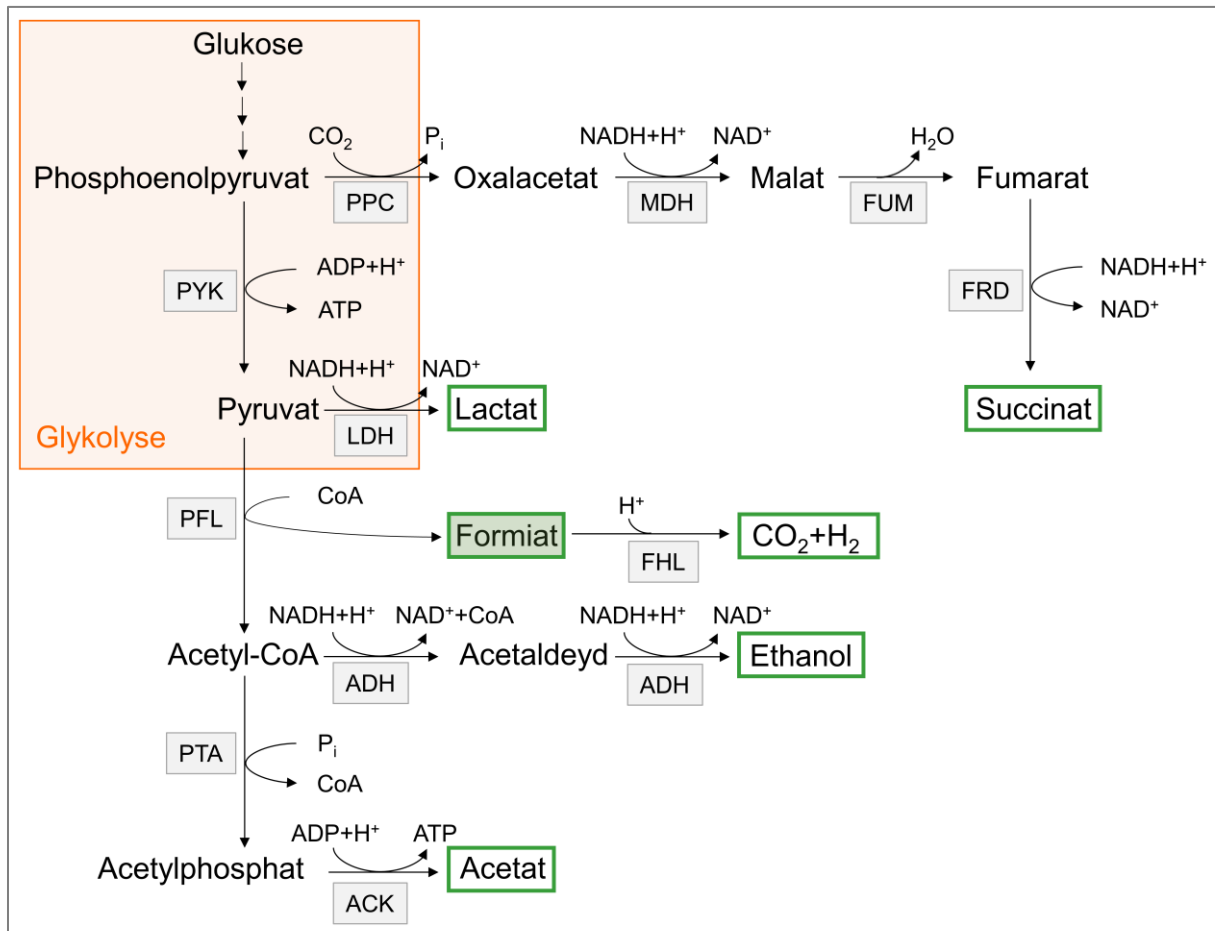


Abbildung 1: Reaktionen der gemischten Säuregärung.

Alle Reaktionen einschließlich der Edukte, Intermediate und Produkte der gemischten Säuregärung sind in der Übersicht dargestellt. Die wichtigsten, für den Stoffwechselweg namensgebenden Produkte, sind außerdem in Grün hervorgehoben. Die abgekürzten Reaktionen der Glykolyse sind in Orange hinterlegt. Die entsprechenden Enzyme sind in Grau hinterlegt und wurden wie nachfolgend aufgeführt abgekürzt: ACK: Acetatkinase, ADH: Acetaldehyddehydrogenase/Alkoholdehydrogenase, FHL: Formiat-Hydrogenlyase, FRD: Fumaratreduktase, FUM: Fumarase, LDH: Lactatdehydrogenase, MDH: Malatdehydrogenase, PFL: Pyruvat Formiat-Lyase, PPC: Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, PTA: Phosphotransacetylase, PYK: Pyruvatkinase. Außerdem wurden die Abkürzungen CoA: Coenzym A und P_i : anorganisches Phosphat verwendet.

Wie für die gemischte Säuregärung namensgebend, entstehen durch diese Gärung, organische Säuren bzw. deren korrespondierenden Anionen Bernsteinsäure/Succinat, Milchsäure/Lactat, Brenztraubensäure/Pyruvat, Essigsäure/Acetate und Ameisensäure/Formiat. Außerdem werden Ethanol und die Gase CO_2 und H_2 gebildet (vgl. Abb. 1).

Der Haupt-Reaktionsweg ist die Umwandlung von Pyruvat in Formiat. Im Vergleich dazu werden Succinat und auch Lactat in verhältnismäßig kleinen Mengen durch alternative Seitenwege gebildet. Die Produktion von Formiat (und auch CoA) wird vom Schlüsselenzym der gemischten Säuregärung, der Pyruvat-Formiat Lyase (PFL), katalysiert. Formiat kann durch den Formiat-Hydrogenlyase Komplex (FHL) zu CO_2 und H_2 umgesetzt werden. Das in der PFL-Reaktion gebildete Acetyl-CoA wird in nachfolgenden Reaktionen durch die enzymatischen Aktivitäten der Alkoholdehydrogenase bzw.

Phosphotransacetylase und Acetatkinase zu Ethanol und/oder Acetat verstoffwechselt. Insgesamt werden in diesem Stoffwechselweg in *E. coli* bis zu drei ATP pro Glukose gebildet und es ergibt sich die nachfolgende quantitative Bilanz der Produkte (Abbildung 2; Sokatch, 1969).

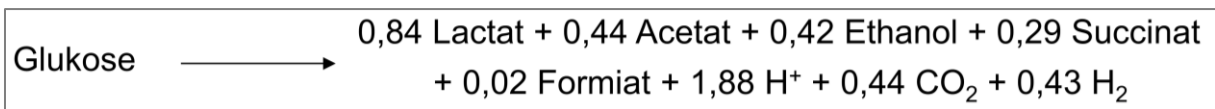


Abbildung 2: Bilanz der gemischten Säuregärung in *E. coli*. (nach Sokatch, 1969)

1.2 Formiat-Metabolismus

Ein großer Anteil Formiat entsteht, wie oben beschrieben (Abschnitt 1.1.1), durch die gemischte Säuregärung, bei welcher PFL-abhängig zwei der sechs Kohlenstoffatome von Glukose zu Formiat umgewandelt und anschließend in der FHL-abhängigen Reaktion (Abschnitt 1.2.2) umgesetzt werden. Dabei werden Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff produziert (Stephenson und Stickland, 1932). Alle Proteine und regulatorischen Elemente, die im anaeroben Formiat-Metabolismus eine wichtige Rolle spielen, gehören zum Formiat-Stoffwechsel (siehe schematische Darstellung in Abbildung 3; zusammenfassende Tabelle 1) und werden in den nachfolgenden Abschnitten detaillierter erläutert.

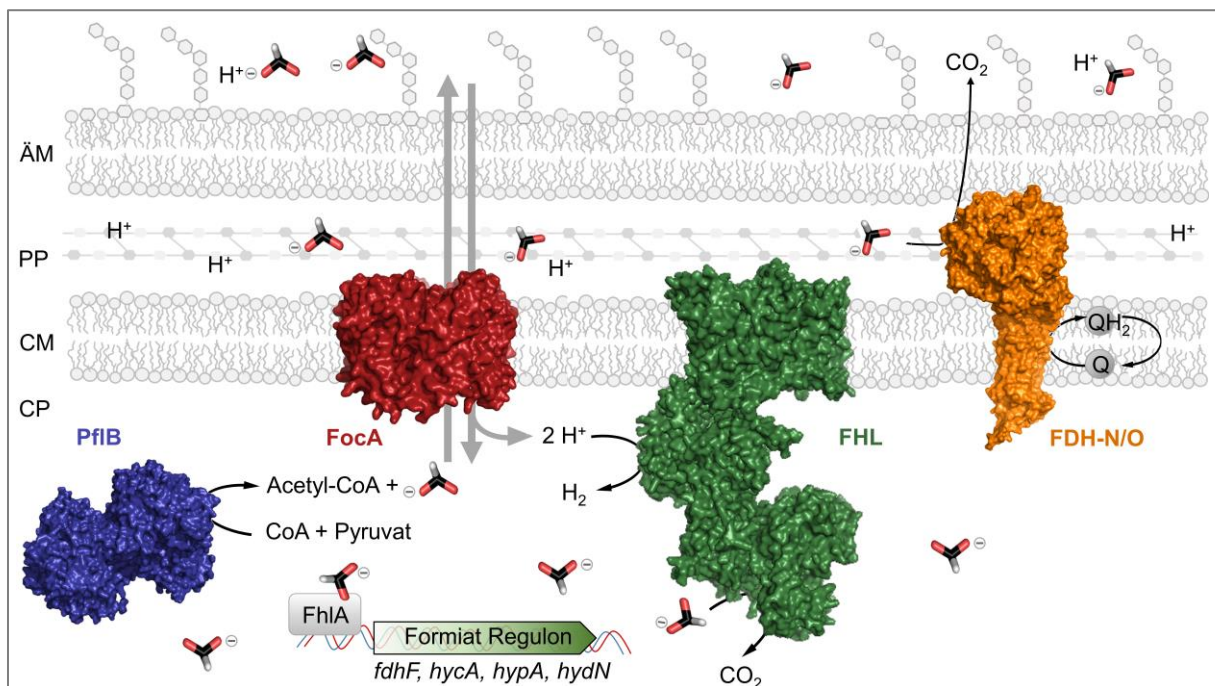


Abbildung 3: Übersicht der wichtigsten Komponenten des Formiat-Stoffwechsels.

Darstellung der Schlüsselkomponenten des Formiat Stoffwechsels in *E. coli*. Das Formiat produzierende Enzym PflB ist in Blau gezeigt (PDB: 1H18; Becker und Kabsch, 2002) der Formiat-Kanal FocA in Rot (PDB: 3KCU; Wang *et al.*, 2009), die Formiatdehydrogenasen FDH-N/O in Orange (PDB: 1KQF, Jormakka *et al.*, 2002) und die Struktur des Formiat-Hydrogenlyase-Komplexes in Grün (vorhergesagte Struktur durch Assemblierung der Untereinheiten nach Pinske und Sawers, 2016). Die Formiat-Oxidation durch FDHs ist in der Regel mit der Fumaratreduktase durch Elektronentransfer mittels Chinon-Pool (gezeigt als QH₂ und Q) gekoppelt. Die Expression der Gene des FHL-1-Komplexes wird durch den Formiat-sensitiven Regulator FhIA reguliert. Die Strukturen der Proteine sind als Oberflächendarstellung visualisiert und nur schematisch, nicht entsprechend ihrer Größe, skaliert. Die Orientierung der Proteine in der Cytoplasmamembran (CM) ist angedeutet und die äußere Membran (ÄM), Periplasma (PP) und das Cytoplasma (CP) sind beschriftet. Das Schema wurde in Zusammenarbeit mit PD Dr. C. Pinske erstellt.

Tabelle 1. Proteine des anaeroben *E. coli* Formiat-Stoffwechsels.

Zusammenfassende Übersicht über Proteine des anaeroben *E. coli* Formiat-Stoffwechsels. Die Referenzen sind nachfolgend aufgelistet. [1] Suppmann und Sawers, 1994; [2] Andrews *et al.*, 1997; [3] Rödel *et al.*, 1988; [4] Pinsent, 1954; [5] Stephenson und Stickland, 1932; [6]: Schlensog und Böck, 1990; [7] Sauter *et al.*, 1992.

Protein	Name	Gen	Funktion	Referenz
FocA	Formiat-Kanal FocA	<i>focA</i>	Bidirektionale Formiat- Translokation	[1]
FocB	Formiat-Kanal FocB	<i>focB</i>	Formiat-Translokation (möglicherweise unter Gukosemangel)	[2]
PflB	Pyruvat Formiat- Lyase	<i>pflB</i>	Glycylradikal-Enzym, welches in der aktivierten Form die Bildung von Formiat und Acetyl-CoA aus Pyruvat und CoA katalysiert	[3]
PflA	Pyruvat Formiat- Lyase Aktivator	<i>pflA</i>	Aktiviert PflB durch ein 5´Dexoxyadenosyl-Radikal	[3]
FDH-N	Formiatdehydro- genase N	<i>fdnG-I</i>	Enzym für die Oxidation von Formiat zu CO ₂ und H ⁺	[4]
FDH-O	Formiatdehydro- genase O	<i>fdoG-I</i>	Enzym für die Oxidation von Formiat zu CO ₂ und H ⁺	[4]
FHL-1	Formiat- Hydrogenlyase Komplex 1	<i>hycBCDEFGHI</i> + <i>fdhF</i>	Haupt-Enzym für die Disproportionierung von Formiat; Katalytisch aktiv sind die Formiatdehydrogenase- Komponente FDH-H und die Hydrogenase Hyd-3	[5]
FHL-2	Formiat- Hydrogenlyase Komplex 2	<i>hyfABCDEFGH</i> + <i>fdhF</i>	Aktivität ähnlich zu FHL-1; wird aber unter anderen Bedingungen synthetisiert	[2]
FhlA	Formiat- Hydrogenlyase Aktivator	<i>fhlA (hyfR)</i>	Formiat-sensitiver Regulator der Transkription des <i>hyc</i> -, <i>hyp</i> - Operons und <i>fdhF</i> HyfR kontrolliert vermutlich speziell die Gene für den FHL-2-Komplex	[6]
HycA	Formiat- Hydrogenlyase Regulator	<i>hycA</i>	Gegenspieler zu FhlA; verhindert die Expression der FhlA- aktivierten Gene	[7]

Formiat/Ameisensäure ist im bakteriellen Stoffwechsel ein zentrales Schlüsselmolekül, welches nicht nur wie bereits gezeigt anaerob, sondern auch unter aeroben Bedingungen, produziert bzw. verbraucht werden kann. Aufgrund seines niedrigen Redoxpotentials $E_0'(\text{CO}_2/\text{HCOO}^-)$ von -432 mV ist Formiat ein effektiver Elektronendonator. So kann es entweder in der aeroben Atmungskette durch Formiatdehydrogenasen (FDHs) oder durch anaerobe Respiration mit verschiedenen terminalen Elektronenakzeptoren (Fumarat, Nitrit oder Nitrat) oxidiert werden. Formiat ist zudem Substrat der Reaktion der anaeroben Ribonukleotidreduktase, welche die Produktion von Desoxyribonukleosid-triphosphaten gewährleistet (Mulliez *et al.*, 1995). Darüber hinaus spielt es in der Aminosäurebiosynthese bei der Umwandlung von Serin zu Glycin eine Rolle, da der C1-Transfer mithilfe des formylierten Cofaktors Tetrahydrofolat (THF) katalysiert wird (Berg *et al.*, 2012). *N*-Formyl-THF ist auch Kohlenstoff-Donor bei der Purinsynthese. Ein moderater Formiat-Anteil wird auch bei der posttranslationalen Deformylierung von *N*-Formyl-Methionin bereitgestellt.

1.2.1 Pyruvat Formiat-Lyase

Wie bereits im Abschnitt 1.1.1 aufgeführt, katalysiert die Pyruvat Formiat-Lyase (PFL, auch Formiat C-Acetyltransferase) die homolytische Spaltung der C1–C2 Bindung von Pyruvat und bildet zusammen mit dem Substrat CoA die Produkte Formiat und Acetyl-CoA (Abbildung 4).

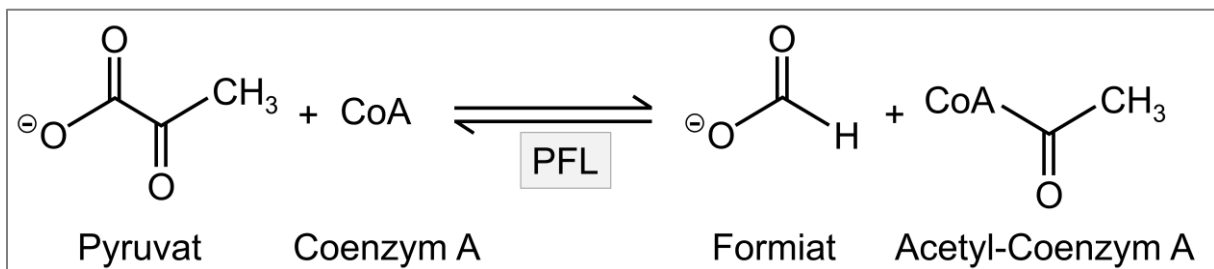


Abbildung 4: Reaktion der Pyruvat Formiat-Lyase.

PFL-ähnliche Enzyme findet man vor allem in Bakterien (Firmicutes, Proteobakterien, Actinobakterien, Bacteroidetes), nur vereinzelt in Archaea (beispielsweise in *Thermococcus*-Spezies) und in wenigen Eukaryota wie Arthropoden, Nematoden oder einigen Grünalgen (eggNog 5.0 Datenbank; Huerta-Cepas *et al.*, 2019 und STRING Datenbank; Szklarczyk *et al.*, 2021, vgl. Abbildung A1 im Anhang). Am weitesten verbreitet sind PFL-Enzyme in Enterobakterien, also vor allem in fakultativen Anaerobiern. Am besten charakterisiert ist die Pyruvat Formiat-Lyase aus *E. coli* (PflB; Rödel *et al.*, 1988). Expressionsstudien zeigten, dass *pflB* in diesem Organismus konstitutiv exprimiert wird, jedoch die Translationsrate unter anaeroben Bedingungen 12- bis 15-fach erhöht ist (Sawers und Böck, 1988). *PflB* gehört zum bicistronischen *focA-pfl* Operon, welches auch für den Formiat-Kanal FocA, codiert (Suppmann und Sawers, 1994; vgl. Abbildung A2 im Anhang). Die sehr komplexe Expression des Operons wird durch sieben Promotoren koordiniert und steht unter der Kontrolle der Transkriptionsregulatoren ArcA und FNR (Sawers und Suppmann, 1992). Direkt benachbart, nur knapp 200 Basenpaare stromabwärts vom *focA-pfl*-Operon des *E. coli* Chromosoms, befindet sich *pflA* (früher *act*), das Gen für das PFL-aktivierende Enzym (vgl. Abbildung A2 im Anhang). *PflA* wird auch konstitutiv,

aber unabhängig von Regulatoren und nahezu unbeeinflusst von der Sauerstoff-Verfügbarkeit exprimiert (Sauter und Sawers, 1990).

Unabhängig vom *focA-pfl*-Operon codiert das *E. coli*-Genom für ein PflB-homologes Protein, die 2-Ketobutyrat Formiat-Lyase TdcE, welches Teil vom *tdcABCDEFG*-Operon ist und dessen Expression Glukose-reprimiert ist (Hesslinger *et al.*, 1998). TdcE weist eine 82 %-ige Sequenzidentität zu PflB auf und ist sowohl in der Lage α -Ketobutyrat als auch Pyruvat anaerob in Formiat und Propionyl-CoA bzw. Acetyl-CoA zu spalten (Hesslinger *et al.*, 1998, Sawers *et al.*, 1998).

TdcE und PflB gehören zur Familie der Glycylradikalenzyme (GREs), welche sich durch einen radikalischen Reaktionsmechanismus auszeichnen (Knappe *et al.*, 1984). GREs katalysieren chemisch sehr herausfordernde Reaktionen wie C–C Bindungsknüpfung und -spaltung (PFL; Wagner *et al.*, 1992), C–O (anaerobe Ribonukleotidreduktase; Mulliez *et al.*, 1995) und C–N-Bindungsspaltung (Cholin-Trimethylamin-Lyase; Craciun und Balskus, 2012).

Die Strukturanalyse von PflB, dem best-untersuchtsten Mitglied dieser Enzymfamilie, zeigt, dass dieses *in vivo* als 170 kDa großes Homodimer vorkommt, bei welchem jedoch nur ein Monomer katalytisch aktiv ist, was als „*half of the sites*“ Aktivität bezeichnet wird (Unkrig *et al.*, 1989; Knappe und Sawers, 1990; Becker *et al.*, 1999). Die katalytisch relevanten Aminosäurereste G734 und die zwei Cysteine C418 bzw. C419 (nach *E. coli* Nummerierung) befinden sich am Ende der β -Schlaufen, die ins Enzyminneren orientiert sind und so vor dem Lösungsmittel, aber vor allem auch vor Sauerstoff geschützt (Peng *et al.*, 2010). Dies ist wichtig, da aktives PflB unter (mikro)-aeroben Bedingungen inaktiviert werden kann, wobei das Proteinrückgrat zwischen S733 und G734 gespalten und damit das Enzym inaktiviert werden kann (Wagner *et al.*, 1992). PflB kann in mikroaeroben bzw. anaeroben Milieu unmittelbar durch die PFL-Aktivase, deren Gen *pflA*, wie bereits erwähnt, ebenso konstitutiv exprimiert wird, zur radikalischen Form aktiviert werden (Unkrig *et al.*, 1989).

PflA gehört zur Superfamilie der radikalischen S-Adenosylmethionin Enzyme und verwendet S-Adenosylmethionin (SAM) und ein [4Fe-4S]-Zentrum als Cofaktor (Külzer *et al.*, 1998). Die reaktive Spezies, welche für die initiale Aktivierung von PflB zuständig ist, ist das 5'-Deoxyadenosyl-Radikal (dAdo; Knappe *et al.*, 1984). Das dAdo-Radikal abstrahiert stereospezifisch das C-2 pro-S-H Atom des Glycins 734 in PflB, welches für die Interaktion mit PflA Oberflächen-exponiert wird, und generiert somit das Glycyl-Radikal (Wagner *et al.*, 1992; Frey *et al.*, 2005; Peng *et al.* 2010). Für die eigentlichen Katalyseschritte ist nach der Aktivierung eine Konformationsänderung notwendig, bei welcher die G734-Schleife anschließend ins Proteininnere inseriert und in die Nähe zu C418 und C419 positioniert wird. Es wurde postuliert, dass dieser Zustand durch Pyruvat, welches direkt im aktiven Zentrum gebundenen ist und als allosterischer Aktivator agiert, stabilisiert wird und außerdem so die Konformationsänderung nach dem Radikal-transfer begünstigt (Becker und Kabsch, 2002; Crain und Broderick, 2014).

Nachfolgend wird der Mechanismus der Formiat-Bildung nach Parast *et al.*, 1995 erklärt, welcher in Abbildung 5 schematisch dargestellt ist. Das Glycylradikal abstrahiert das H-Atom der Thiol-Gruppe des C419 und dieses Thiyl-Radikal generiert dann ein radikalisches tetrahedrales Oxyradikal-Intermediat. Bei der Spaltung der C1–C2 Bindung des Intermediates entstehen das S-Acetyl-PFL und das Formyl-Radikalanion, welches das H-Atom der anderen Thiol-Funktion abstrahiert. So wird das radikalische

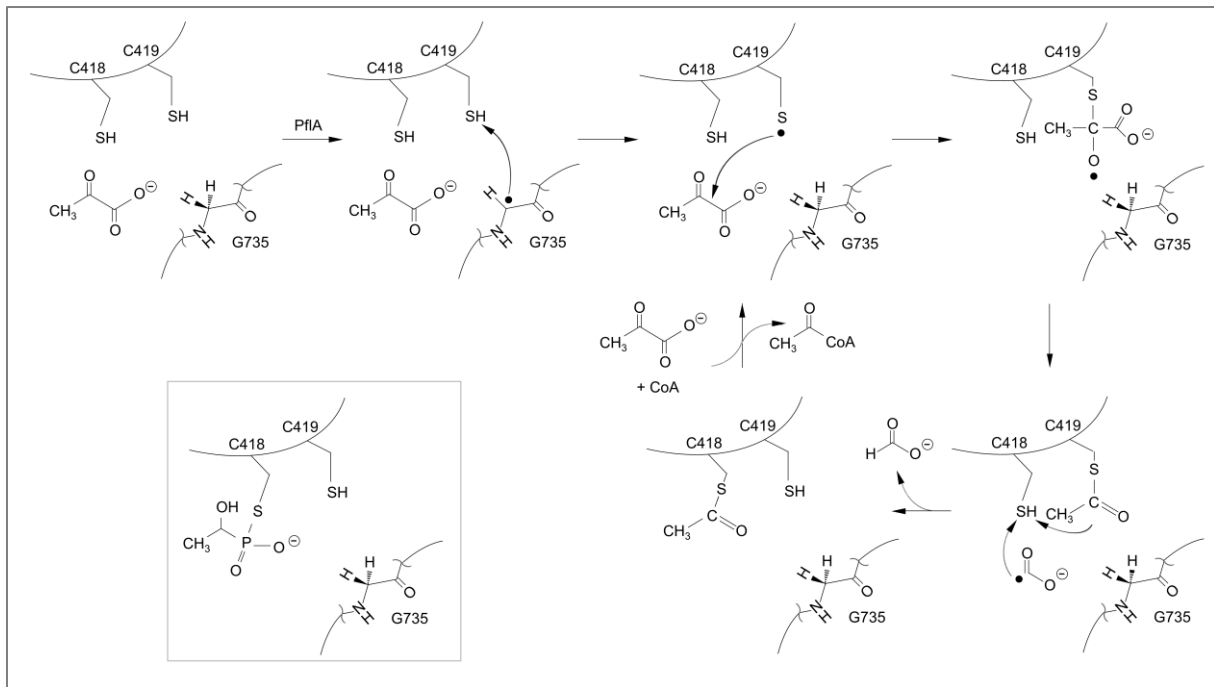


Abbildung 5: Reaktionsmechanismus der Pyruvat Formiat-Lyase.

a) Schematische Darstellung der PFL-Katalyse (nach Parast *et al.*, 1995).

b) Hypophosphit-gebundenes PFL, welches weitere Katalyseschritte verhindert und damit das Enzym inaktiviert (nach Knappe und Sawers, 1990).

katalytische Zentrum wiederhergestellt und ein neuer Katalysezyklus kann beginnen. Zwischen C419 und C418 findet vermutlich ein Transfer der Acetyl-Gruppe statt und das acetylierte C418 vermittelt den Thioester-Austausch mit CoA (Mechanismus nach Brush *et al.*, 1988; Parast *et al.*, 1995; Abbildung 5a). Die PFL-Reaktion ist zwar reversibel, aber die Bildung von Formiat und Acetyl-CoA ist stark begünstigt, was sich in der freien Enthalpie (ΔG^0) von $-16,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ und einer katalytischen Effizienz der Reaktion von 770 s^{-1} (Rückreaktion $k_{\text{cat}} K_m^{-1} = 260 \text{ s}^{-1}$) zeigt (Knappe *et al.*, 1974).

Der Katalyse der Formiat-Bildung erfolgt nach einem Ping-Pong-Mechanismus, welcher u.a. auch mit Inhibitoren, welche als Selbstmord-Substrate in den Mechanismus eingreifen, aufgeklärt wurde (Knappe *et al.*, 1974). Phosphinate wie Hypophosphit werden während der Katalyse aufgrund ihrer Formiat-ähnlichen Struktur im Zentrum des acetylierten Enzyms erkannt, kovalent gebunden und inhibieren den Fortgang des Katalyse-Zyklus (Plaga *et al.*, 1988; Knappe *et al.*, 1984, Struktur vgl. Abb. 5b).

1.2.1 Weitere Komponenten des Formiat-Stoffwechsels

Neben dem zentralen Enzym der gemischten Säuregärung (PflB) spielen weitere Proteine eine zentrale Rolle im Formiat-Stoffwechsel: die Formiatdehydrogenasen (FDHs). FDHs sind Selenoproteine mit Molybdopterin-Dinukleotid-Cofaktor, welche die Oxidation von Formiat zu Kohlenstoffdioxid und Protonen katalysieren (Pinsent, 1954). In *E. coli* gibt es drei verschiedene Enzyme, die je nach Verfügbarkeit von Elektronenakzeptoren gebildet werden bzw. aktiv sind. FDH-O wird sowohl unter aeroben Bedingungen als auch anaerob mit Nitrat als terminalem Elektronenakzeptor, gebildet (Pinsent, 1954; Sawers *et al.*, 1991). Unter Gärungsbedingungen spielt die Aktivität von FDH-O nur eine geringe Rolle (Pinske und

Sawers, 2016). Die wichtigste Formiatdehydrogenase unter Nitrat Respirationsbedingungen ist FDH-N, welche die Oxidation von Formiat mit dem Transfer der Elektronen zur Nitratreduktase *via* Ubichinon/Menachinon koppelt (Enoch und Lester, 1975; Neidhardt *et al.*; 1987; Li und Stewart, 1992).

Die dritte Formiatdehydrogenase, FDH-H, welche unter Gärungsbedingungen und bei Abwesenheit von terminalen Elektronenakzeptoren gebildet wird, ist Teil des FHL-1-Komplexes (Peck und Gest, 1957). Die Expression von FDH-H, welche durch das monocistronische *fdhF*-Gen codiert wird, und weiterer Hydrogenase Gene wird direkt durch die intrazelluläre Formiat-Konzentration reguliert und daher als Formiat-Regulon bezeichnet. Generell wird dessen Expression durch Formiat, Molybdat und einem pH-Wert unterhalb 7 gesteigert (Birkmann *et al.*, 1987; Rossmann *et al.*, 1991; Rosentel *et al.*, 1995). Die Anwesenheit von Sauerstoff und/oder Nitrat haben eine reprimierende Wirkung (Pecher *et al.*, 1983). Eine Schlüsselrolle in der Expression des Regulons spielt insbesondere der transkriptionelle Formiat-Hydrogenlyase Aktivator (FhIA) (Sankar *et al.*, 1988; Schlensog und Böck, 1990). Das *fhIA* Gen wird unter der Kontrolle eines eigenen Promotors in geringem Level transkribiert, jedoch findet unter anaeroben Bedingungen FNR-abhängig eine erhöhte Expression statt (Rossmann *et al.*, 1991; Leonhartsberger *et al.*, 2002). Das FhIA-Protein gehört zur NtrC-Gruppe von transkriptionellen Regulatoren, welche eine N-terminale Domäne A, eine konservierte zentrale Domäne C und eine C-terminale Domäne D aufweisen. Die Domäne C besitzt die ATP Bindestelle und interagiert mit der RNA Polymerase und dem σ -54 Faktor (Drummond *et al.*, 1986). Wenn Formiat intrazellulär im niedrigen millimolaren Konzentrationsbereich akkumuliert, bindet es an die Domäne A von FhIA. Die apparente Bindungskonstante beträgt 5 mM (Hopper und Böck, 1995). Die Assoziation des Effektormoleküls (Formiat) reguliert dann das Binden von ATP und dessen Hydrolyse (Leonhartsberger *et al.*, 2000). In Anwesenheit von hohen Formiat- und ATP-Konzentrationen und in der Nähe der DNA-Bindestellen, den stromaufwärts liegenden regulatorischen Sequenzen, oligomerisiert FhIA, bindet die DNA als vermutlich tetrameren Komplex und initiiert die Transkription der σ -54 Promotoren (Birkmann und Böck, 1989, Hopper *et al.*, 1996, Leonhartsberger *et al.*, 2000). Neben FhIA, welches die Expression einer Vielzahl von (De)-hydrogenase Genen durch positive Rückkopplung verstärkt, gibt es auch einen Gegenspieler: das Formiat-Hydrogenlyase regulatorische Protein HycA (Sauter *et al.*, 1992). Die Expression von *hycA* ist ebenfalls Formiat- bzw. FhIA-abhängig. Wie genau der molekulare Mechanismus der Repression der Genexpression des Formiat-Regulons durch HycA funktioniert, ist noch nicht aufgeklärt. Die folgenden zwei Modelle erscheinen schlüssig; zum einen könnte HycA direkt an FhIA binden und durch die Interaktion die FhIA-Aktivität unterbinden oder zum anderen könnte es direkt in die Reduktion der zellulären Formiat-Konzentration involviert sein, indem es beispielsweise den Formiat-Export erleichtert (Leonhartsberger *et al.*, 2002).

FhIA und auch HycA können somit die Expression von *fdhF* zusammen mit den Hydrogenase-3 Genen (*hyd-3*; Nummerierung entsprechend, weil es in *E. coli* insgesamt drei Hydrogenasen gibt) Formiat-abhängig kontrollieren (Peck und Gest, 1957; Pecher *et al.*, 1983; Birkmann *et al.*, 1987). FDH-H ist die katalytische Untereinheit des FHL-Komplexes, in welcher Formiat in einer reversiblen Reaktion zu CO₂ oxidiert wird. Die Elektronen, die bei dieser Reaktion entstehen, werden über Eisen-Schwefel-Zentren der verschiedene FHL-1-Untereinheiten zur [NiFe]-Hydrogenase Hyd-3 übertragen, und zur Reduktion von zwei Protonen zu molekularem Wasserstoff genutzt (Pinske und Sawers, 2016).

Für die Assemblierung eines aktiven FHL-1-Komplexes sind insgesamt mindestens 15 Gene notwendig, welche zum *hycA-I*-Operon oder dem sich in inverser Orientierung dazu befindenden *hypA-E*-Operon, dessen Genprodukte für die Reifung der drei *E. coli* Hydrogenasen eine entscheidende Rolle spielen, gehören (Böhm *et al.*; 1990; Lutz *et al.*; 1991; Sauter *et al.*, 1992; Pinske und Sawers, 2016). Der Aufbau des L-förmigen FHL-1-Komplexes wurde durch Analysen mit Deletionsvarianten des *hyc*-Operons, Reinigung des Komplexes und dessen Cryo-EM-Struktur analysiert (Sauter *et al.*, 1992; McDowall *et al.*, 2014; Steinhilper *et al.*, 2022). Die transmembranen Untereinheiten des FHL-Komplexes sind HycC und HycD. FDH-H ist mit dem Komplex an der Membran assoziiert und interagiert über hydrophobe Interaktionen und Wasserstoffbrücken mit HycB und durch elektrostatische Anziehung mit HycF (Steinhilper *et al.*, 2022). HycE und HycG sind die große und kleine Untereinheit der Hyd-3, welche mit ihren [FeS]-Zentren und dem [NiFe]-Cofaktor die reversible Reduktion von Protonen zu Wasserstoff katalysieren (McDowall *et al.*, 2014). HycB ist die kleine Untereinheit der FDH und überträgt Elektronen über [FeS]-Zentren. Diese Untereinheit steht in direkter Verbindung mit HycC und HycD. Der Elektronentransfer wird durch das Eisenschwefelzentrum von HycF gewährleistet. HycH übernimmt als Chaperon eine wichtige Funktion in der Assemblierung der Hyd-3 (Lindenstrauß *et al.*, 2017). Die Endopeptidase Hycl prozessiert die katalytische Untereinheit HycE nachdem der [NiFe]-Cofaktor inseriert wurde (Rossmann *et al.*, 1995). Ein weiterer Locus des Formiat-Regulons weist die zwei Gene *hydN* und *hypF* auf, welche für die Aktivität des FHL-Komplexes wichtig sind (Maier *et al.*, 1996).

Neben dem FHL-1-Komplex gibt es in *E. coli* noch einen zweiten FHL-ähnlichen Komplex (FHL-2), dessen Untereinheiten im *hyf*-Operon codiert werden und der als Hyf oder Hydrogenase-4 bezeichnet wird (Andrews *et al.*, 1997). Das *hyf*-Operon codiert neben den strukturellen Komponenten für die [NiFe]-Hydrogenase auch einen FhIA-ähnlichen Aktivator, *hyfR*, und direkt benachbart *focB*, das Gen für einen weiteren putativen Formiat Transporter (Andrews *et al.*, 1997). Die Bedingungen unter welchen der *E. coli* FHL-2-Komplex synthetisiert wird und auch die biochemischen Eigenschaften des Komplexes sind noch nicht im Detail aufgeklärt, jedoch ist klar, dass in *E. coli* FHL-1 die Hauptfunktion in der Disproportionierung von Formiat einnimmt (Skibinski *et al.*, 2002; Self *et al.*, 2004; McDowall *et al.*, 2014). Beide FHL-Komplexe weisen strukturelle Ähnlichkeit zum Komplex I der Atmungskette auf und aufgrund der erforderlichen Membran-Assoziation der katalytischen Domänen wurde postuliert, dass in den transmembranen Untereinheiten Ionen transloziert werden und FHL als Protonenpumpe eine energiekonservierende Funktion einnimmt (Böhm *et al.*, 1990; Andrews *et al.*, 1997).

Da Formiat die Synthese vieler Komponenten des fermentativen Stoffwechsels beeinflusst, ist es ein zentrales Effektormolekül. Die Regulation der Formiat-Konzentration in der Zelle ist wichtig und wird nicht nur durch den Umsatz mittels FDHs, sondern auch durch den Formiat-Efflux und die Wiederaufnahme, welche ebenso mit der Disproportionierung durch den FHL-Komplex verbunden ist, kontrolliert. Diese Strategie verhindert eine intrazelluläre Formiat-Akkumulation und eine mögliche Entkopplung des Membranpotentials. Aufgrund des intrazellulären pH-Wertes zwischen 7,2 und 7,9, liegt Ameisensäure ($pK_a \approx 3,75$) zu 99,99 % in der dissoziierten Form vor und kann als monovalentes, polares Anion die Cytoplasmamembran nicht einfach durch Diffusion passieren (Hersh *et al.*, 1996). Die bidirektionale Formiat-Translokation erfolgt daher hauptsächlich durch den Formiat-Kanal FocA, welcher durch einen komplexen Mechanismus reguliert wird (Suppmann und Sawers, 1994).

1.3 Der Formiat-Kanal FocA als Vertreter der FNTs

Als erster Vertreter der Formiat-Nitrit-Transporter-Familie (FNTs) wurde ein Formiat-translozierendes Kanalprotein von Suppmann und Sawers 1994 identifiziert. In einem *Screening* wurden initial Mutanten isoliert, welche sich durch eine erhöhte Resistenz gegenüber Hypophosphit, einem toxischen Formiat-Analogon (vgl. Abschnitt 1.2.1), auszeichneten. Diese Mutanten wiesen die Insertion eines Transposons im *pfl*-Operon auf und so konnte das Genprodukt des *pfl*-benachbarten Gens als putativer Formiat-Kanal FocA annotiert werden (Suppmann und Sawers, 1994).

Die Benennung der Proteinfamilie als Formiat-Nitrit-Transporter leitet sich von den ersten zwei Vertretern, die Formiat- und Nitrit-Ionen translozieren (FocA und NirC), und von der durch Saier durchgeführten phylogenetischen Charakterisierung, ab (Saier; 1999). Die Vertreter der FNT-Familie sind ursprünglich als Kanalproteine klassifiziert, jedoch steht diese Zuordnung unter Diskussion. Da außerdem nicht final geklärt ist, ob ein Netto-Transport von organischen Säuren (bzw. Anion und H⁺) oder deren entsprechenden Ionen stattfindet, wird in der Regel ausschließlich das Ion bezeichnet, bei Hypothesen zum detaillierteren Mechanismus hingegen eine stärkere Differenzierung vorgenommen.

An dieser Stelle sollte auch erwähnt werden, dass wenn in den folgenden Abschnitten bzw. Kapiteln die Begriffe Transport, Export oder Import bzw. Efflux oder Influx zur Beschreibung der Translokation der Ionen genutzt werden, dies nicht auf Grundlage der eindeutigen Zuordnung als Kanal oder sekundär aktiver Transporter/Ionen-Pumpe erfolgt. Vielmehr ermöglichen diese Begriffe eine einfachere Differenzierung der Richtung der Translokation.

1.3.1 Familie der FNTs

Die Familie der FNTs besteht aus pentameren Kanälen, welche Anionen wie Formiat, Nitrit, Hydrosulfid, und auch Lactat translozieren (Wang *et al.*, 2009). FNTs gehören der Transporter Klasse 2.44 und der MIP-Superfamilie (*major intrinsic proteins*), welche u.a. Glyceroporine und Aquaporine beinhalten, an (Park und Saier, 1996). Letztere weisen, trotz großer Unterschiede in Funktion, Primär- und Tertiärstruktur (Aquaporine sind Tetramere), eine sehr ähnliche α -helikale Topologie mit einer sanduhrförmigen Protomer-Struktur und vielen konservierten Aminosäuren, die auch in FNTs zu finden sind, auf.

Die Familie der FNTs ist allgemein sehr weit verbreitet. Das heißt sie kommen in allen drei Domänen des Lebens: Bakteria, Archaea und teilweise in niederen Eukaryota vor (Saier *et al.*, 1999). Etwa 85 % der bereits identifizierten FNTs sind in Bakterien zu finden, wobei sie zu ähnlichem Anteil in gram-negativen und grampositiven Bakterien vorliegen (Mukherjee *et al.*, 2017). Die meisten FNT-Vertreter in Archaea gehören zum Phylum Euryarchaeota und die Mehrheit der eukaryotischen FNTs sind dem Phylum der Fungi zuzuordnen (Mukherjee *et al.*, 2017).

Die Entdeckung der FNTs, wie schon am Beispiel von FocA beschrieben, steht nicht nur in Verbindung mit im direkten Metabolismus assoziierten Proteinen, sondern auch mit der Organisation der jeweiligen Gene. Wie schon in Abschnitt 1.2.1 erläutert, befinden sich *focA* und *pflB* in einem Operon (vgl. Abb. A1, Anhang) und die Co-Expression unterliegt einer komplexen Regulation. Im Gegensatz zu *pflB*, werden *focA*-Transkripte nur anaerob synthetisiert (Sawers und Böck, 1989; Sawers und Watson, 1998).

Ein Ortholog von FocA ist das in *Methanobacterium formicicum* vorkommende FdhC, ein ebenso Formiat aufnehmendes Protein. Das *fdhC*-Gen ist Teil des *fdh*-Operons, welches zudem eine Formiatdehydrogenase codiert (White und Ferry, 1992; Nölling und Reeve, 1997). Das Nitrit aufnehmende Protein, NirC, ist nach dem zugehörigen Gen benannt und mit den cytoplasmatischen Nitritreduktasen (NirBD) genomisch und funktional assoziiert, da diese Nitrit zu Ammonium-Ionen umsetzen (Peakman *et al.*, 1990; Clegg *et al.*, 2002). Ein weiterer wichtiger Vertreter der FNTs ist das Hydrosulfid exportierende Membranprotein HSC (*hydrosulfide channel*) aus *Clostridioides difficile*, welches genomisch direkt benachbart von den Sulfitreduktase-Genen *asrABC* liegt und die bei der Sulfitreduktion entstehenden toxischen Hydrosulfid-Ionen aus dem Cytoplasma entfernt (Czyzewski und Wang, 2012). Weitere Vertreter, welche zur Familie der FNTs gehören, sind ein mutmaßlicher Acetat/Protonen Symporter, Yha8, aus *Saccharomyces cerevisiae* und der Lactat/Protonen-Symporter PfFNT aus *Plasmodium falciparum* (Casal *et al.*, 1996; Saier *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2015).

Die Vertreter der FNT-Familie sind sich strukturell sehr ähnlich. In der Regel haben die Protomere eine Länge von 256-285 Aminosäuren und weisen sechs bis acht transmembrane α -Helices auf (Saier *et al.*, 1999). Eine Ausnahme stellt der Symporter in *S. cerevisiae* Yha8 dar, dessen monomere Form eine C-terminale Verlängerung von ca. 400 Aminosäuren aufweist (Saier *et al.*, 1999).

Die topologische Ähnlichkeit ist aber nicht auf die Primärsequenz zurückzuführen, denn ein *alignment* und die Evaluierung der Sequenzidentität mittels CLUSTAL OMEGA (Webserver, Version 1.2.4; Madeira *et al.*, 2022) zeigt bei der Analyse von *E. coli* FocA, *E. coli* FocB, *E. coli* NirC, *M. formicicum* FdhC und *C. difficile* HSC eine maximale Identität von 50 % (*E. coli* FocA und *E. coli* FocB). Den geringsten Wert von ca. 25 % lieferte der Vergleich von *E. coli* FocA und *C. difficile* HSC. Dennoch gibt es, vor allem für die Translokation der jeweiligen Ionen, wichtige Aminosäuren, welche in allen FNTs konserviert sind. Zwei Aminosäuren sind an dieser Stelle hervorzuheben; ein zentrales Threonin (in *E. coli* FocA T91) und ein mechanistisch bedeutsames Histidin (in *E. coli* FocA H209). Weitere konservierte Aminosäuren werden im Rahmen der Beschreibung der Struktur des *E. coli* FocA Protomers (Abschnitt 1.3.2, Abbildung A3 im Anhang) bzw. in der Diskussion (3.2.3) ausführlicher geschildert.

Der am wenigsten konservierte Bereich der FNTs ist der N-Terminus, welcher im Cytoplasma liegt. In Abbildung 6 ist diesbezüglich ein Sequenzvergleich der im vorherigen Abschnitt vorgestellten FNTs gezeigt. Es fällt auf, dass nicht nur die Länge der N-Termini stark variiert, sondern sich auch die einzelnen Aminosäuren funktional unterscheiden, was in einer Sequenzidentität von 14-31 % zum Ausdruck kommt (CLUSTAL OMEGA, Version 1.2.4; Madeira *et al.*, 2022). Dieser Proteinbereich ist vermutlich sehr flexibel, weshalb die erste *E. coli* FocA Kristallstruktur von einem am N-Terminus um 21 Aminosäure verkürzten FocA Protein stammt, da die Strukturdaten des Volllängenproteins eine geringe Auflösung aufwiesen (PDB: 3KCU; Wang *et al.*, 2009). Die hohe Flexibilität und auch Variabilität der FNTs könnte damit begründet werden, dass Interaktionen mit cytoplasmatischen Proteinen stattfinden, was bereits für FocA und PflB nachgewiesen werden konnte (Doberenz *et al.*, 2014). Dies schließt eine Vernetzungsanalyse zwischen PflB und FocA, welche wechselwirkende Aminosäuren identifizierte, und verschiedenen *in vivo* Versuche ein, welche zudem die Involvierung in der Anion-spezifischen FocA-abhängigen Translokation andeuten (Beyer *et al.*, 2013; Doberenz *et al.*, 2014).

CdHSC	--MSKGFLTPGETAQAATISA---GIKKANISTQN---	29
MfFdhC	--MASSFKSPADTAKACVGV---AALKEKAPLSNLIV	32
EcNirC	-----MFTDTINKC-AANAARIAR-LSANNPL-----	25
EcFocA	MKADNPFDLLLPAAMAKVAEEAGVYKATKHPLKTFY-	36
EcFocB	MRNKLSFDLQLSARKAAIAERIAAHKIARSKVSVF--	35
	* * . .	

Abbildung 6: Sequenzvergleich der N-terminalen Bereiche verschiedener FNTs.

Zum Sequenzvergleich des N-terminalen Bereichs der FNTs wurden über CLUSTAL OMEGA (Webserver, Version 1.2.4; Madeira *et al.*, 2022) nachfolgende Sequenzen in einem *alignment* verglichen: *E. coli* FocA (1-36), *E. coli* FocB (1-35), *E. coli* NirC (1-25), *M. formicicum* FdhC (1-32) und *C. difficile* HSC (1-29). Die Sequenzidentität der anderen FNTs im Vergleich zu *EcFocA* liegt zwischen 13,8 % (*CdHSC*) und 31,4 % (*EcFocB*).

Allgemein gehen die Aussagen wie selektiv die FNTs für ihre jeweils namensgebenden Ionen sind, sehr weit auseinander und sind insbesondere davon abhängig, welche analytischen Methoden zur Adressierung dieser Fragestellung genutzt wurden. In elektrophysiologischen *in vitro* Analysen der FocA-abhängigen Permeation konnte eine Selektivität für monovalente Anionen festgestellt werden. Diese schließen im Fall von *S. enterica* ser. Typhimurium FocA (*StFocA*) die Produkte der gemischten Säuregärung (Formiat, Acetat und Lactat), aber auch Hypophosphit und Nitrit, sowie Chlorid-Ionen ein (Lü *et al.*, 2012a, Waight *et al.*, 2013). Generell war die Formiat-Permeabilität von *StFocA* am höchsten und bi-, trivalente Anionen (Sulfat, Hydrogenphosphat, Citrat), sowie Kationen wurden nicht transloziert (Lü *et al.*, 2012a). Elektrophysiologische Untersuchung von *S. enterica* ser. Typhimurium NirC (*StNirC*) in Proteoliposomen zeigten, dass neben Nitrit-Ionen auch Formiat transloziert wurde (Lü *et al.*, 2012b).

In vivo Studien demonstrierten hingegen, dass FocA sehr spezifisch für die Translokation von Formiat ist. So zeigten Zeitaufgelöste Studien mit einem Parentalstamm und einer *focA*-Mutante, dass die extrazelluläre Konzentration der Produkte der gemischten Säuregärung (Succinat, Acetat, Pyruvat und Lactat) im Laufe der Kultivierung unabhängig vom Vorhandensein des Formiat-Kanals anstieg, aber im Parentalstamm die Formiat-Konzentration in den Zellen zunächst zu und dann wieder abnahm (Suppmann und Sawers, 1994, Beyer *et al.*, 2013). Dies belegt, konträr zu den elektrophysiologischen Daten, dass unter physiologischen Bedingungen, wenn alle möglichen Interaktionspartner von FocA und andere Komponenten des Formiat-Regulons synthetisiert werden, FocA Formiat *in vivo* mit hoher Spezifität translozieren kann. Da sich die Profile des intra- bzw. extrazellulären Formiat-Levels in der *focA*-Mutante und im Parentalstamm grundsätzlich ähnlich waren und nur in der Signal-Intensität stark variierten, lässt sich ableiten, dass es alternative, noch nicht identifizierte Formiat-translozierende Systeme neben FocA gibt (vgl. Abbildung A4 im Anhang).

Desweiteren implizieren diese Analysen von Suppmann und Sawers, dass FocA abhängig von den physiologischen Bedingungen, für den Formiat-Efflux und auch dessen Influx sorgen kann. Für die anderen FNTs hingegen konnte diese Bidirektionalität noch nicht in *in vivo* Analysen nachgewiesen werden. Aufgrund ihrer physiologischen Funktion, die oft nur eine Richtung des Transportes begründet, kann vermutet werden, dass einige FNTs die Ionen nur unidirektional translozieren. Insgesamt weisen die Mitglieder der FNT-Familie zahlreichen Gemeinsamkeiten auf, und mit Ausnahme des N-Terminus, ähneln sie sich strukturell sehr stark, worauf im nächsten Abschnitt eingegangen werden soll.

1.3.2 Struktur des FNT-Protomers am Beispiel von FocA

Vor einigen Jahren gerieten die FNT-Proteine in den Fokus von verschiedenen Proteinkristallographie-Arbeitsgruppen und so konnte 2009 die erste *E. coli* FocA Struktur gelöst werden (PDB: 3KCU; Auflösung 2,25 Å; Wang *et al.*, 2009). Es folgten die Strukturen von *Vibrio cholerae* FocA (PDB: 3KLY; Auflösung 2,1 Å; Waight *et al.*, 2010), *S. enterica* FocA (PDB: 3Q7K; Auflösung 2,8 Å; Lü *et al.*, 2011), *C. difficile* HSC (PDB: 3TDO/3TDP/3TDR; Auflösung 2,2-3,2 Å; Czyzewski und Wang, 2012) und *S. enterica* NirC (PDB: 4FC4; Auflösung 2,4 Å; Lü *et al.*, 2012b). Sämtliche Strukturdaten bestätigten, dass die integralen Membranproteine, wie für FocA unter nativen Bedingungen gezeigt wurde, als Homopentamer mit sehr hohem α -helikalem Anteil vorkommen (Falke *et al.*, 2010; vgl. Abbildung 7a, Abbildung A5 im Anhang). Das FNT-Pentamer weist einen Durchmesser von ca. 80 Å und eine Höhe von 48-55 Å auf (Wang *et al.*, 2009; Waight *et al.*, 2010; Lü *et al.*, 2012b, vgl. Abb. 7). Sowohl FocA als auch NirC besitzen an der cytoplasmatisch orientierten Oberfläche des Pentamers positiv geladene Aminosäuren, wohingegen auf der periplasmatisch exponierten Oberfläche eher negative Ladungen, die von basischen Seitenketten stammen, zu finden sind (Wang *et al.*, 2009; Lü *et al.*, 2012b).

Die Anordnung der Protomere ist symmetrisch und erfolgt um eine zentrale Weinglas-förmige Kavität (mit der größten Öffnung zum Periplasma, siehe Abb. 7a), deren zentraler Bereich bei *EcFocA* einen Durchmesser zwischen 3,8 und 9 Å hat, *in vitro* mit Detergenz-Molekülen und innerhalb der Membran wahrscheinlich mit Lipiden gefüllt ist (Wang *et al.*, 2009). Der Efflux bzw. Influx der zu translozierenden Ionen erfolgt nicht durch diese Kavität, sondern durch die hydrophoben Kanäle, welche sich im Zentrum eines jeden Protomers befinden (siehe Abbildung 7b; Wang *et al.*, 2009; Waight *et al.*, 2010).

Im Folgenden wird die Topologie der Protomere und insbesondere der Translokationspore genauer beschrieben, welche in Abbildung 7b und 8 für *EcFocA* gezeigt ist. Sowohl der N- als auch C-Terminus der Protomere sind im Cytoplasma lokalisiert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die letzten sechs Aminosäuren des C-Terminus (in *EcFocA* R280-H285) wichtig für die Formiat-Permeation, jedoch nicht essentiell für die Synthese bzw. Membranintegrität der Proteine sind (Hunger *et al.*, 2017). Der bereits im vorherigen Abschnitt beschriebene N-terminale, helikale Bereich von FocA ist sehr flexibel, vermutlich strukturell und mechanistisch relevant und interagiert mit PfIB (Doberenz *et al.*, 2014). Die transmembranen Helices (TM) 1, 3, 4 und 6 sind durchgängige α -Helices. TM2 und 5 hingegen bestehen jeweils aus zwei α -Helices, welche über eine Schlaufe miteinander verbunden sind. TM2a und 2b sind über die Ω -Schlaufe verknüpft und TM5a und 5b über die S-Schlaufe (Aminosäuren 205 – 209), wobei sich die Bezeichnungen von der strukturellen Ähnlichkeit zu den Buchstaben ableiten (Wang *et al.*, 2009). TM3 und 4 bzw. TM5 und 6 sind über flexible Schlaufen im Periplasma verbunden. Obwohl sich der Strukturbereich TM1-3 (Aminosäuren 29-136 nach *EcFocA* Nummerierung) und TM4-6 (Aminosäuren 160-276) in der Primärstruktur sehr stark unterscheiden, sorgt die strukturelle Organisation für eine Pseudo-Symmetrie (Wang *et al.*, 2009). Die transmembranen Helices 1-6 sind so angeordnet, dass sie einen amphipathischen Kanal bilden. Das bedeutet, dass sich am cytoplasmatischen und periplasmatischen Eingang der Pore (im Englischen als *vestibule* und im Deutschen als Eingang bzw. Vorraum bezeichnet) viele geladene und polare Aminosäuren befinden, der zentrale Bereich der Pore ist jedoch sehr hydrophob.

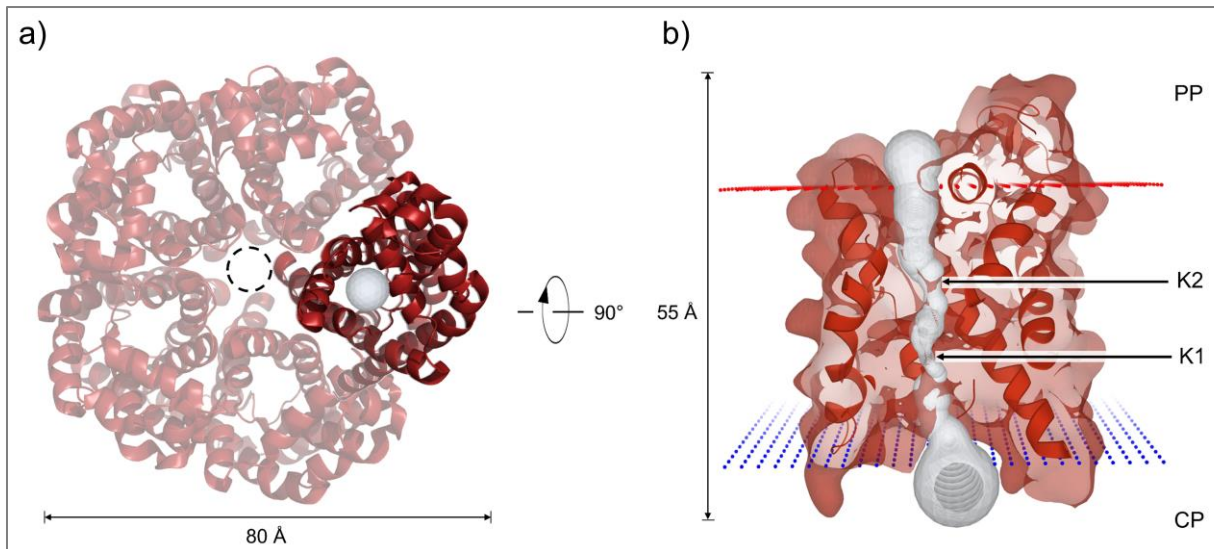


Abbildung 7: Struktur des *E. coli* Formiat-Kanals FocA.

Darstellung der Tertiär- und Sekundärstruktur des *E. coli* Formiat-Kanals FocA (PDB: 3KCU; Wang *et al.*, 2009). In beiden Strukturen ist das Proteinrückgrat und in b) zusätzlich die Oberfläche des Proteins visualisiert. Die Dimensionen (Durchmesser in a und Höhe des Kanals in b) sind in Å angegeben.

a) Draufsicht auf das Homopentamer von der periplasmatischen Seite. FocA ist in der Bänderdarstellung gezeigt. Die zentrale Kavität ist mit einem gestrichelten Kreis angedeutet und die Translokationspore eines Monomers ist in Grau hervorgehoben.

b) Querschnitt des Monomers in der Cytoplasmamembran mit modulierter Translokationspore (in Grau). Die Oberfläche des Proteins und dessen Sekundärstruktur als Bänder wurden visualisiert. Die Berechnungen erfolgten mittels MOLE online Version 2.5 (Pravda *et al.*, 2018). Als maximaler Radius des Kanals wurden 6 Å und als Mindestradius im Inneren der Pore 1 Å festgesetzt. Die beiden Konstriktionen der Pore sind mit Pfeil und der Beschriftung K1 und K2 hervorgehoben. Die Position des Kanals in der Cytoplasmamembran ist durch die Begrenzung des Cytoplasmas (CP) in Blau und des Periplasmas (PP) in Rot angezeigt.

Die nachfolgenden Erläuterungen zur Translokationspore beziehen sich auf die Strukturdaten der N-terminal verkürzten *EcFocA*-Struktur (PDB: 3KCU; Wang *et al.*, 2009) und die Nummerierung der Aminosäuren erfolgt, wenn nicht anders gekennzeichnet, nach der *E. coli* FocA Sequenz (vgl. Abbildung A6a im Anhang). Als maximaler Durchmesser der Translokationspore wurden 3,5 Å bestimmt (Smart *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2009). Zudem finden sich in der annähernd Sanduhr-förmigen Pore zwei Engstellen, die cytoplasmatische und periplasmatische Konstriktion, welche den hydrophoben zentralen Teil der Pore, welcher etwa 15 Å lang ist, begrenzen (vgl. Abb. 7b). Für die periplasmatische Konstriktion sorgen vor allem zwei gegenüberliegende Phenylalanin-Seitenketten (F75 und F202), welche die Pore an dieser Stelle zu einem Durchmesser von 1,8 Å verengen. Die cytoplasmatische Engstelle, welche einen Durchmesser von 1,35 Å hat, wird vor allem durch die unpolaren Seitenketten der Aminosäuren L79 und L89 gebildet. Im Zentrum der Translokationspore befinden sich die relevanten Aminosäuren T91 (auf der flexiblen Ω -Schlaufe) und H209 (am Ende der S-Schlaufe, kurz bevor diese in TM5b übergeht), welche einen Abstand von 5,7 Å aufweisen (Distanz von N_{ε2} von Histidin und Sauerstoff-Atom der Threonyl-Seitenkette; Wang *et al.*, 2009; vgl. Abb. 8). Stabilisiert werden die beiden Schlaufen durch eine Reihe von Wechselwirkungen mit den Aminosäure-Seitenketten, die sich in der näheren Umgebung dazu befinden, bzw. durch Interaktionen mit dem Peptidrückgrat. In Bezug auf die Stabilisierung der Ω -Schlaufe leisten Interaktionen dieser Aminosäuren mit L37, D88, F90, N121 und N172 einen wichtigen Beitrag und im Fall der S-Schlaufe finden Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten und K156, H159, L167, E208, S210, N231 und N262 statt (Wang *et al.*, 2009).

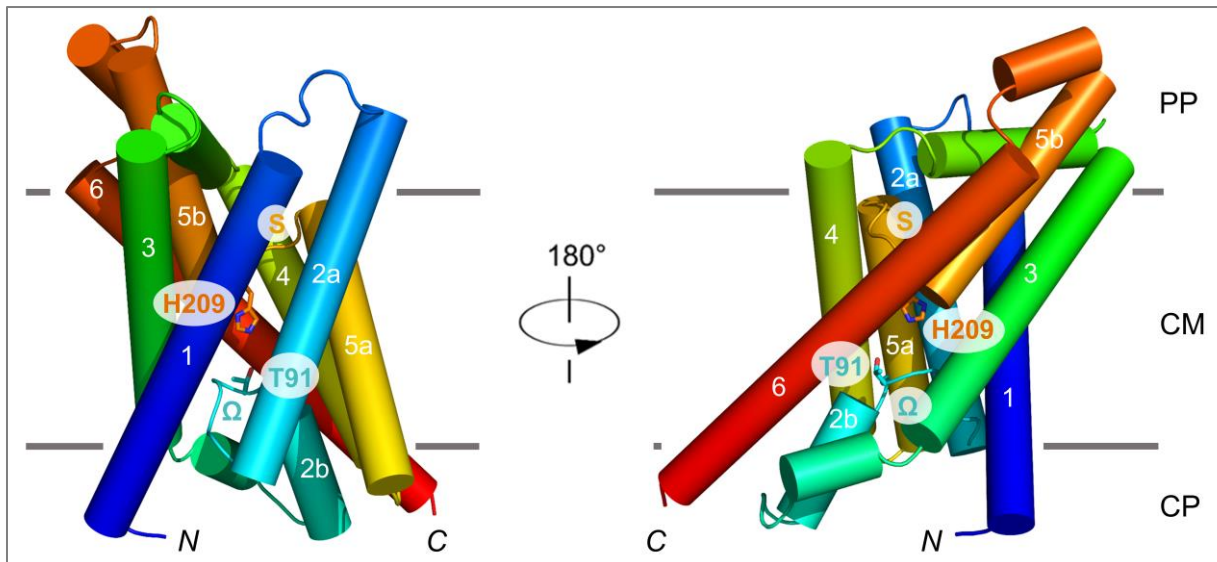


Abbildung 8: Sekundärstrukturelemente des *E. coli* Formiat-Kanals FocA.

Darstellung der Sekundärstruktur eines *EcFocA* Protomers (PDB: 3KCU; Wang *et al.*, 2009) mit den α -Helices als Zylindern (ähnlich wie Abbildung 2 aus Wang *et al.*, 2009). Die sechs transmembranen α -Helices sind nummeriert und wurden jeweils unterschiedlich koloriert. Die Ω und S-Schleife, welche TM2a und 2b bzw. TM5a und 5b verbinden, und die Seitenketten der konservierten und mechanistisch wichtigen Aminosäuren T91 und H209 sind dargestellt. Der N- und C-Terminus des Protomers, welcher sich im Cytoplasma befindet ist beschriftet. Die Position des Kanals in der Cytoplasmamembran ist durch die Begrenzung des Cytoplasmas (CP) und des Periplasmas (PP) angezeigt.

Die Architektur der Pore und einige Aminosäuren in der unmittelbaren Nähe der Konstriktionen fungieren als Selektivitätsfilter und bewirken so, dass weder polare Moleküle wie Wasser oder freie Protonen, noch größere und geladene Moleküle die Pore passieren können (Wang *et al.*, 2009; Waight *et al.*, 2010 und 2013; Lv *et al.*, 2013; Atkovska und Hub, 2017). In der *EcFocA* Kristallstruktur ist der Durchmesser der Pore zu gering, als dass Formiat-Ionen passieren könnten, daher sind Konformationsänderungen für die Translokation notwendig.

In den Strukturen von *EcFocA* (PDB: 3KCU), *CdHSC* (PDB: 3TDP/3TDR/3TDO) oder *StNirC* (PDB: 4FC4) sind alle Protomere nahezu deckungsgleich, jedoch variiert der Abstand des Threonins und Histidins (vgl. Abbildung A5 im Anhang). So liegen die beiden Seitenketten dieser Aminosäuren in HSC und NirC in Wasserstoffbrückendistanz (Abstand ≤ 3 Å; Czyzewski und Wang, 2012; Lü *et al.*, 2012b; Abb. A5 im Anhang). In *EcFocA* überschreitet die Distanz der Aminosäuren die Restriktionen einer Wasserstoffbrückenbindung (Abstand von T91 und H209 beträgt 5,7 Å; Wang *et al.*, 2009).

Im Gegensatz dazu weist die Kristallstruktur von *VcFocA* (PDB: 3KLY; Waight *et al.*, 2010) verschiedene Konformationen der Protomere auf, die sich im Wesentlichen in der Orientierung der Ω -Schleife bzw. des konservierten Threonins (in *VcFocA* T90 und in *EcFocA* T91) unterscheiden (vgl. Abbildung 9). Das sich im Zentrum der Translokationspore befindliche Histidin (in *VcFocA* H208), dessen Imidazol-Ring in Richtung der Ω -Schleife orientiert ist, ist fixiert und je nach Orientierung der Threonyl-Seitenkette interagieren beide Aminosäuren in einigen Protomeren über Wasserstoffbrückenbindung (Abstand < 3 Å). Als „geschlossener“ Zustand der Pore wird von der Arbeitsgruppe um D. N. Wang die Konformation definiert, in welcher T90 und H208 über Wasserstoffbrückenbindung wechselwirken und sie postulieren, dass so eine ungehinderte Passage der Formiat-Ionen unterbunden werden kann

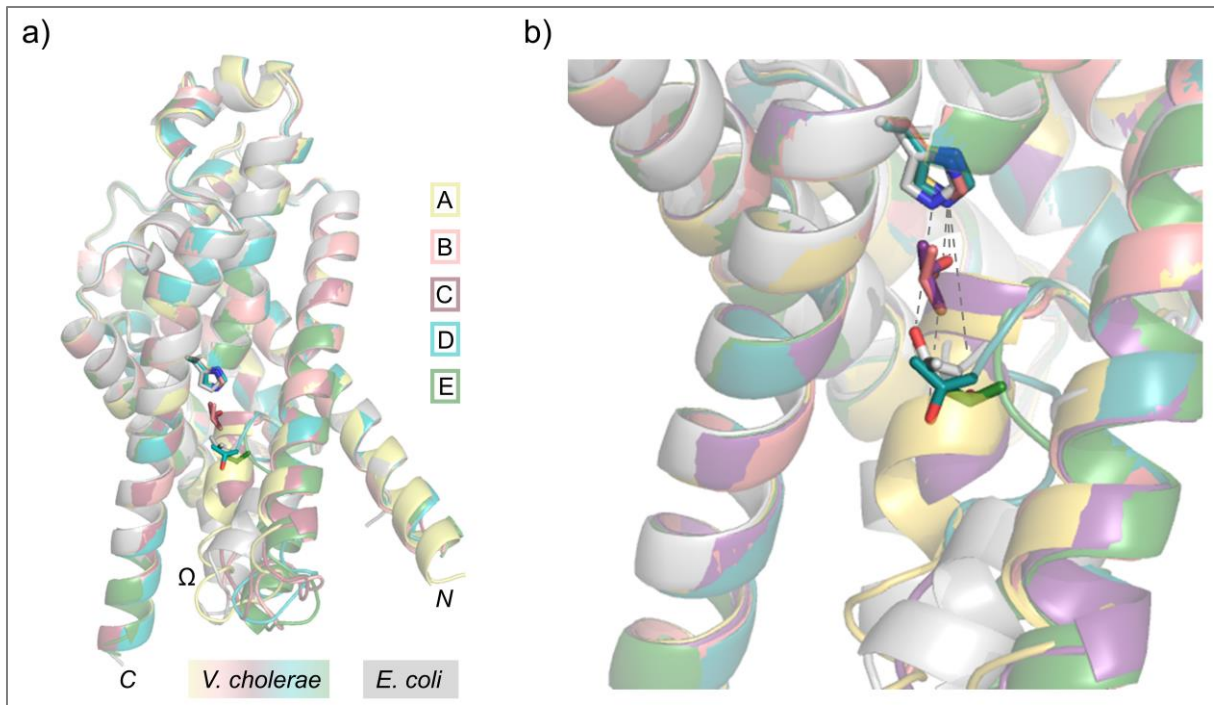


Abbildung 9: Konformationen der Ω-Schleife in *Vibrio cholerae* FocA.

Struktureller Vergleich der Sekundärstruktur eines *E. coli* FocA Protomers (in Grau; PDB: 3KCU, Wang *et al.*, 2009) und den verschiedenen Protomeren (A bis E) der *V. cholerae* FocA (bunt; PDB: 3KLY, Waight *et al.*, 2010). Die Superposition der VcFocA Monomere in Bezug zum EcFocA Protomer lieferte bei der strukturbasierten Berechnung RMSD-Werte zwischen 0,484 – 0,532 Å (Berechnung mit PyMOL durch den „super“-Befehl mit 5 Verbesserungszyklen; *The PyMOL Molecular Graphics System*, Version 2.5, Schrödinger, LLC). Das Peptidrückgrat ist in Bänderstruktur-Darstellung und die Seitenketten der Aminosäuren Histidin (H209 EcFocA bzw. H208 in VcFocA) und Threonin (T91 EcFocA bzw. T90 in VcFocA), sowie der N- und C-Terminus sind gezeigt.

a) Darstellung des gesamten Protomers, bei welcher die unterschiedlichen Konformationen des Ω-Schleife und des Threonins im Vergleich zu den sonst sehr ähnlich strukturierten Bereichen hervorgehoben werden.

b) Zentraler Teil der FocA Pore und Fokus auf die Abstände zwischen Threonin und Histidin. Mittels PyMOL wurden die Abstände der funktionellen Gruppen berechnet ($N_{\epsilon 2}$ von Histidin und Sauerstoff-Atom der Threonyl-Seitenkette). In EcFocA beträgt dieser 5,7 Å. In drei der fünf VcFocA Monomere (A, B und C) liegt er zwischen 2,8 Å und 3,2 Å. In Monomer D sind Threonin und Histidin 9,6 Å und in Monomer E 8,4 Å entfernt.

(Waight *et al.*, 2010). Die Strukturdaten von StFocA (PDB: 3Q7K; Lü *et al.*, 2011) bei pH 4 zeigen drei Konformationen der Protomere, welche als „geöffneter“, „intermediärer“ und „geschlossener“ Zustand der Translokationspore beschrieben werden. Diese Konformationen unterscheiden sich in der Position und im Ordnungsgrad der Ω-Schleife, das heißt dem Anteil des α-helikalen Proteinbereichs oder der flexiblen und möglicherweise erweiterten Schleife. Im Gegensatz zur VcFocA Struktur, bei welcher alle N-Termini ungeordnet vorliegen, gibt es in der StFocA Struktur je nach Konformation N-Termini, welche einen freien bzw. versperrten Zugang zum Eingang der Translokationspore aufweisen (Lü *et al.*, 2011).

Inwiefern Konformationsänderungen für die Permeation der Ionen notwendig sind und wodurch diese induziert werden, ist nicht final geklärt. Weiterhin gibt es verschiedene Erklärungen bezüglich der quarternären Struktur der FNTs. Die pentamere Architektur sorgt für Stabilität in der Membran und ermöglicht Wechselwirkungen zwischen den Protomeren, woraus sich die Frage ergibt, ob dies eine allosterische Regulation der Ionen-Translokation bewirkt (Wang *et al.*, 2009). Entsprechende Untersuchungen zur Kooperativität der Aktivität sind jedoch nicht eindeutig (Lü *et al.*, 2012a und b). Verschiedene Modelle, die versuchen, die Translokation zu erklären, werden im folgenden Abschnitt erläutert.

1.3.3 Translokationsmechanismus der FNTs

Wie in den vorhergehenden Abschnitten bereits beschrieben, werden die Fragen, ob FNTs als Transporter oder Kanäle einzuordnen sind, ob sie bidirektional translozieren und welche mechanistischen Funktion die stark konservierten Aminosäuren spielen, kontrovers diskutiert. Außerdem herrscht keine Einigkeit darüber, ob nur die Anionen allein oder im Symport mit Protonen transloziert werden und wie der Transport gesteuert wird, das heißt, ob eine pH- oder Ligandenabhängigkeit besteht. Aus Simulationen der Moleküldynamik, Berechnungen ausgehend von quantenmechanischen Modellen und Kalkulationen zu pK_a -Werten konnte für den Translokationszyklus abgeleitet werden, dass die zu transportierenden Ionen die hydrophobe Pore der FNTs nicht als geladene Spezies passieren können. Eine Permeation der Ionen erfordert einen Protonierungsschritt, in welchen das zentrale Histidin (H209 in *EcFocA*) involviert ist (Atkovska und Hub, 2017). Diese transiente Protonierung der Anionen findet in den meisten hypothetischen Modellen Berücksichtigung. Die meisten Hypothesen zur Ionen-Permeation der FNTs, welche vor ca. 10 Jahren beschrieben wurden, basieren jedoch vielmehr auf elektrophysiologischen Untersuchungen, den strukturellen und *in silico* Daten und nicht auf *in vivo* Translokationsaktivitäten. Eine Übersicht über die bereits publizierten hypothetischen Mechanismen gibt Abbildungen 10.

Von der Arbeitsgruppe um O. Einsle, welche sich mit der strukturellen und funktionalen Charakterisierung des StNirC beschäftigte, wurde für die Anionen-Aufnahme ein „Protonenzyklisierungsmodell“ aufgestellt (vgl. Abb. 10a; Lü *et al.*, 2012b). Dabei protoniert das Imidazoliumkation des konservierten Histidins das zu translozierende Ion, was eine Verschiebung des Wasserstoffbrückennetzwerkes von Histidin, Threonin und einem Wassermolekül bewirkt. Nachdem die Säure den hydrophoben Teil der Pore überwunden hat, transferiert diese das Proton auf Wasser. Das resultierende Oxonium-Ion (H_3O^+) leitet das Proton über das Wasserstoffbrückennetzwerk zurück an die Imidazol-Seitenkette des Histidins und ermöglicht damit den Beginn eines neuen Zyklus.

Erläuterungen, wie das zu transportierende Anion in den Eingang der Pore gelangt und was die Translokation antreibt, werden von der Arbeitsgruppe um E. Beitz in dem Modell zur elektrostatischen Anziehung der Ionen bzw. der Verschiebung deren Azidität aufgeführt (Abb. 10b; Wiechert und Beitz, 2017). Dabei wird die wichtige Rolle eines im periplasmatischen Eingang der Pore lokalisierten Lysins (in *EcFocA* K156), welches durch die elektrostatische Anziehung das Anion in den Kanal „zieht“, postuliert. Es wurde zudem die Verringerung der Azidität des Ions kalkuliert, was die Protonierung durch freie Protonen im periplasmatischen Teil der Pore begünstigen könnte. Die neutrale Spezies kann so die hydrophobe Pore passieren. Desweiteren schreibt E. Beitz dem im cytoplasmatischen Eingang der Pore positionierten Lysin (K26) Bedeutung in der Anziehung des Ions zu, welches so effizienter durch den cytoplasmatischen Vorraum der Pore geleitet werden könnte. Die Hypothesen beziehen sich vor allem auf die Anionen-Aufnahme (Formiat und Lactat) und resultieren aus den Analysen von *EcFocA* bzw. *PfFNT* im heterologem Hefesystem (Wu *et al.*, 2015; Wiechert *et al.*, 2017). Generell werden keine konkreteren Aussagen zur Funktion des Histidins oder Threonins gemacht, aber es wird behauptet, dass Histidin für die Permeation nicht relevant sei, da *FocA*-Varianten mit H209-Substitutionen durch nicht protonierbare Aminosäuren (in *Entamoeba histolytica* N283 und in *Bacillus thuringiensis* Q202) einen pH-abhängigen und *EcFocA*-ähnlichen Aufnahmemechanismus zeigten (Helmstetter *et al.*, 2019).

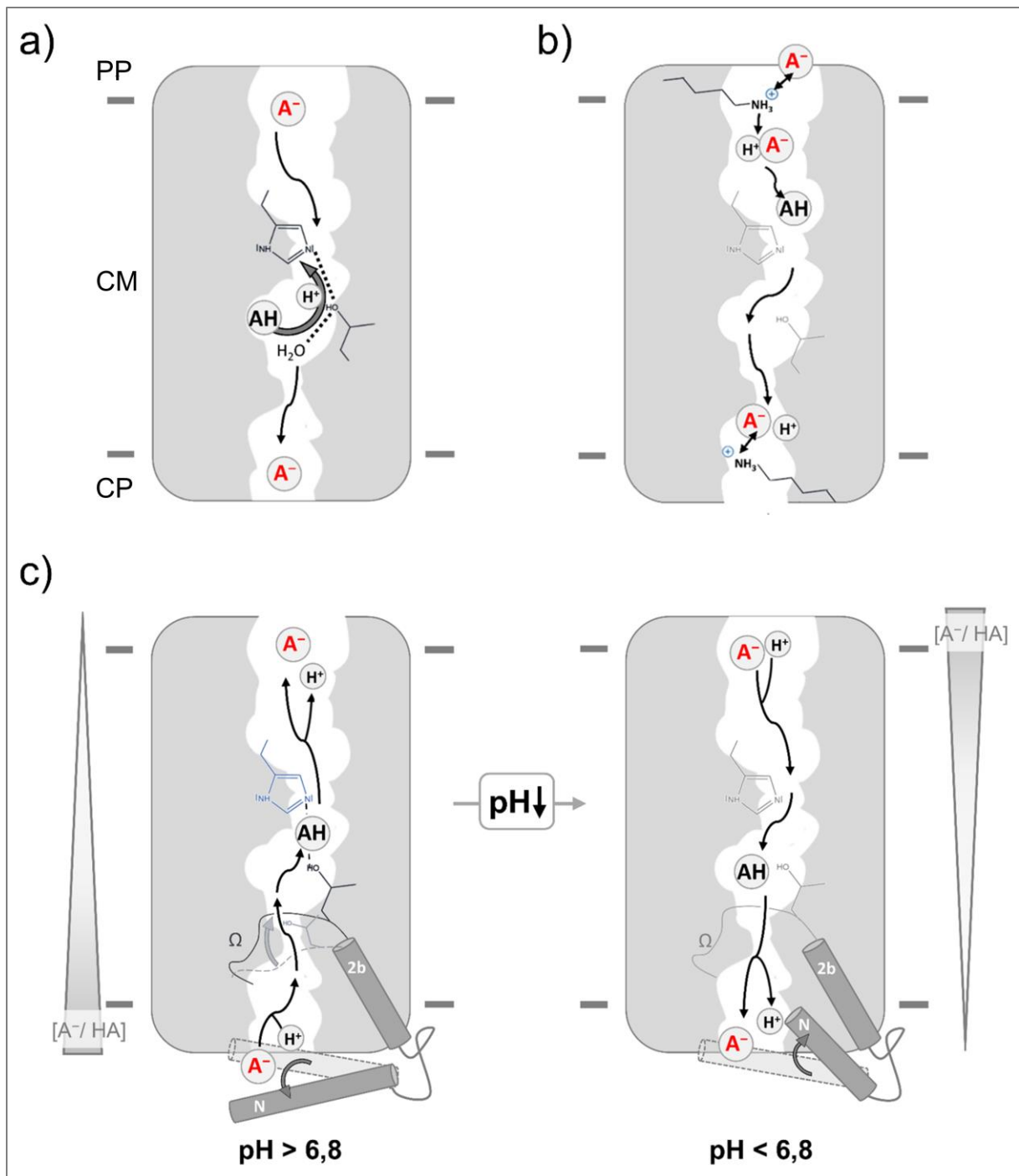


Abbildung 10: Postulierte Translokationsmechanismen der FNTs.

Für die FNTs wurden verschiedene Mechanismen, die eher Kanal-artigem bzw. Transporter-ähnlichem Verhalten folgen, aufgestellt. Die Abbildungen zeigen schematisch die Translokationspore (in Weiß) im FNT-Protein (in Hellgrau). Das zu transportierende Anion (A⁻) sowie die neutrale Spezies (HA) sind repräsentativ für Formiat, Nitrit etc. und deren korrespondierende Säure dargestellt. Weiterhin sind die Strukturen des konservierten Threonins und Histidins in der Translokationspore gezeigt. Die Position des Protomers in der Membran (CM) ist durch die Beschriftung des CP-Cytoplasmas bzw. PP-Periplasmas visualisiert.

a) Modell der Protonen-Zyklisierung bei der Anionen-Aufnahme (in NirC; nach Lü *et al.*, 2012b)

b) Modell der elektrostatischen Anziehung der Ionen bzw. Verschiebung deren Azidität (allgemein für FNTs; nach Wiechert und Beitz, 2017)

c) Modell des pH-abhängigen *gatings* aufgestellt (in FocA nach Lü *et al.*, 2011).

Ein drittes Modell, welches die pH-abhängige Translokation in FocA detaillierter beschreibt, wurde ebenfalls von der Arbeitsgruppe um O. Einsle ausgehend von experimentellen Daten zu StFocA aufgestellt (vgl. Abb. 10c; Lü *et al.*, 2011). Wie in 1.3.2 beschrieben ist, wurden für die StFocA Monomere verschiedene Konformationen strukturell gelöst. Diese Änderungen der Position der N-terminalen Helix und der Ω -Schleife sind auch mechanistisch von Bedeutung. Das Modell besagt, dass Formiat bei einem pH-Wert unter 6,8 aus der Zelle transportiert wird, was nur möglich ist, wenn der N-Terminus des FNTs so orientiert wird, dass der Eingang der Pore freigegeben wird. Dem zentralen Histidin wird die Funktion als „pH-Sensor“ zugeschrieben. Bei sinkendem pH ($< 6,8$) ändert sich der Translokationsmodus und Formiat wird im Symport mit einem Proton aus dem Periplasma aufgenommen. Um die cytoplasmatische Konstriktion zu passieren, wird eine erneute Konformationsänderung, die zur Positionierung der N-terminalen Helix führt, beschrieben, welche dazu führt, dass das Anion ins Cytoplasma gelangen kann.

Die mechanistische Bedeutung der Aminosäuren T91 und H209 in *E. coli* FocA für die Formiat-Permeation konnte bereits durch *in vivo* Studien mittels eines Formiat-sensitiven Reporter-Systems in verschiedenen *focA*-Mutanten nachgewiesen werden. Im Zuge dieser Analysen zeigten zwei FocA-Varianten einen sehr auffälligen Phänotyp. So sorgte eine Komplementation der *focA*-Mutanten mit Plasmiden, welche für die Aminosäureaustauschvarianten FocA_{T91A} bzw. FocA_{H209Y} codieren, für die intrazelluläre Akkumulation von Formiat (Hunger *et al.*, 2014). In Importanalysen wurde eine verringerte Aufnahme von Formiat/Ameisensäure in einer FocA_{H209Y}-Substitutionsvariante beobachtet, währenddessen der T91A-Austausch hingegen wenig Einfluss auf die FocA-abhängige Formiat-Aufnahme hatte (Hunger *et al.*, 2014). Diese Ergebnisse implizieren, dass Formiat-Efflux bzw. -Influx durch unterschiedliche Translokationsmechanismen gewährleistet wird. Das von L. Beyer, C. Doberenz, D. Falke und D. Hunger (Arbeitsgruppe von G. Sawers, MLU Halle) in ihren Promotionsarbeiten etablierte und weiterentwickelte Reporter-System diente dabei als Grundlage für die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Studien und soll nachfolgend erläutert werden.

1.4 Methoden zur Analyse der Formiat-Translokation

Um die mechanistischen Details der Formiat-Translokation aufzuklären, was insbesondere die Analyse der Funktion spezifischer Aminosäuren bzw. Sequenzmotiven einschließt, wurde zunächst eine Vielzahl von Plasmiden erstellt, die für die gewünschten FocA-Varianten codieren (Proteinsequenz von FocA siehe Abbildung A6a im Anhang). Die Translokationsaktivität der FocA-Varianten wurden in verschiedenen Stammhintergründen, welche sich in der Anwesenheit des Formiat-produzierenden Enzyms PflB und dessen Aktivase PflA unterscheiden, untersucht (vgl. zusammenfassende Tabelle A1 im Anhang). Durch den Vergleich der Ergebnisse mit den *focA*, *pflB* und/oder *pflA*-Mutanten konnte der Einfluss der Interaktion mit PflB (in aktivem bzw. nicht aktiviertem Zustand) studiert werden und es war eine differenziertere Analyse des Formiat-Effluxes (interne PflB-abhängige Produktion von Formiat) und des Ionen-Influges (bei Mutanten, welche kein bzw. kein aktivierbares PflB-synthetisieren, erfolgte die Supplementierung des Kulturmedium mit Natriumformiat) möglich. Da alle *focA*, *pflB* und/oder *pflA*-Mutanten mit einem λ -Phagen transduziert wurden, welcher das *fdhF_p::lacZ* Fusions-Konstrukt chromosomal integrierte, konnte die intrazellulären Formiat-Konzentration analysiert werden (Falke *et*

al., 2010). Im Detail bedeutet das, dass in Abhängigkeit von Formiat, wobei eine Konzentration im niedrigen millimolaren Bereich notwendig ist, die Expression des *lacZ*-Gens induziert wird (Hopper und Böck, 1995). Die gebildete β -Galaktosidase katalysiert die hydrolytische Spaltung des Substrates *para*-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid (PNPG) in den Zucker-Anteil und *p*-Nitrophenol, was spektrophotometrisch detektiert werden kann und daher indirekt Rückschluss auf die intrazelluläre Formiat-Konzentration ermöglicht (Miller, 1972; Methode vgl. Kammel *et al.*, 2021, Abbildung 11). Im Vergleich zu Kontrollstämmen, den plasmidfreien *focA*-Mutanten, bzw. den Parentalstämmen, die natives *FocA* synthetisieren, konnte so der Formiat-Efflux- und -Influx der Varianten beurteilt werden.

Eine weitere Methode, die indirekte Aussagen über das cytosolische Formiat-Level ermöglicht, ist die Bestimmung des bei der FHL-Reaktion entstehenden Wasserstoffes mittels Gaschromatographie (GC; Pinske, 2018; Kammel *et al.*, 2022a). Zusätzlich können das exportierte Formiat bzw. Ameisensäure und weitere organische Säuren, die im Rahmen der gemischten Säuregärung gebildet werden, sowie der Umsatz der Glukose durch hochleistungsflüssigkeitschromatographische Untersuchung des Kulturüberstands quantifiziert werden (Kammel *et al.*, 2021).

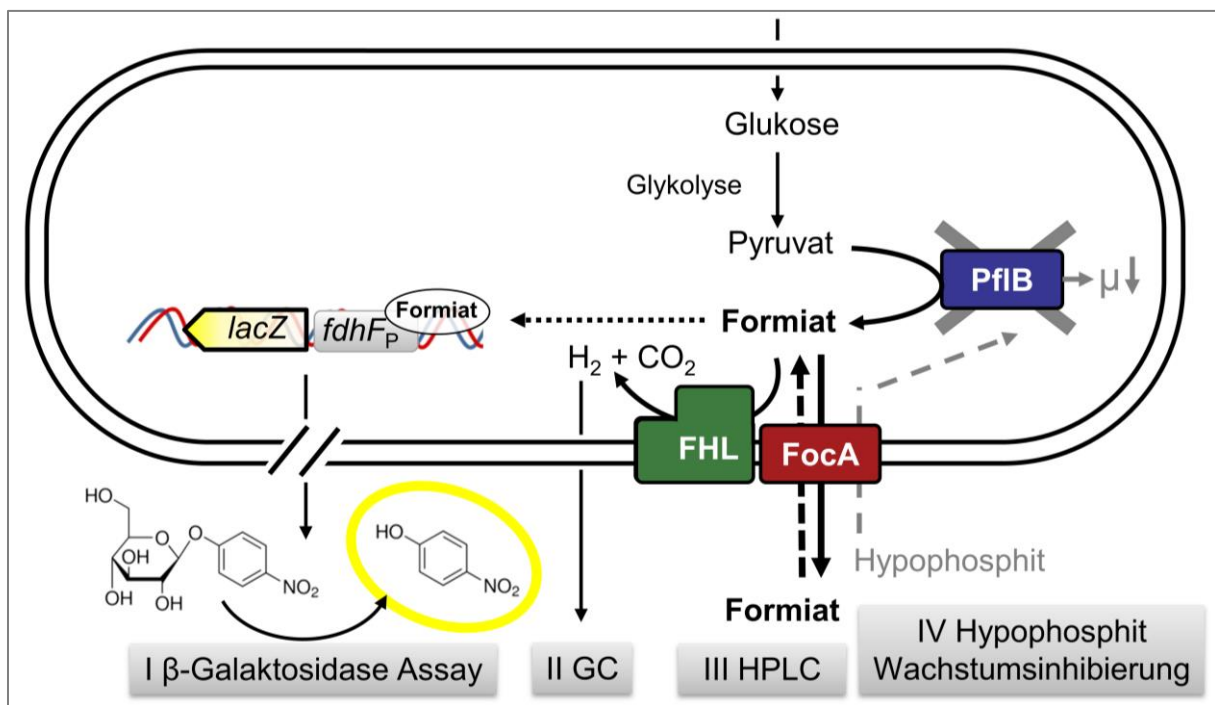


Abbildung 11: Methoden zur Analyse der Formiat-Translokation.

Schematischer Überblick der *in vivo* Methoden zur Analyse der *FocA*-abhängigen Formiat-Translokation. Exemplarisch ist ein gärendes Bakterium, welches durch die gemischte Säuregärung u.a. Formiat durch die Pyruvat Formiat-Lyase (PflB)-abhängige Katalyse produziert, gezeigt. Dieses wird durch den Formiat-Kanal *FocA* bidirektional transloziert und kann bei Wiederaufnahme in die Zelle durch den Formiat-Hydrogenlyase-(FHL-1)-Komplex umgesetzt werden. Die Stämme, welche in der Doktorarbeit verwendet wurden, weisen alle chromosomal das *fdhF_P::lacZ* Reporterkonstrukt auf (Falke *et al.*, 2010). Die Formiat-induzierte Expression des *lacZ*-Gens ermöglicht die Analyse der intrazellulären Formiat-Level. Im β -Galaktosidase assay (I) wird bei der Hydrolyse von *para*-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid (PNPG) u.a. *p*-Nitrophenol gebildet, dessen Konzentration durch seine gelbe Farbe spektrophotometrisch quantifiziert werden kann. Das extrazelluläre Formiat-Level wird über die flüssigkeitschromatographische Analyse des Kulturmediums bestimmt (HPLC; III). Die FHL-abhängige Produktion von Wasserstoff wird über gaschromatographische Untersuchungen des Gasraums der Kulturen detektiert (GC; II). Die Analyse der Hypophosphit-bedingte Wachstumsreduktion (IV) zeigt, ob das Formiat-Analogon *FocA*-abhängig aufgenommen wird, da dieses cytosolische Proteine wie PflB inhibiert und damit die Wachstumsrate der Zellen reduziert. Alle aufgeführten Methoden erfolgen nach dem Protokoll in Kammel *et al.*, 2021 und 2022a.

Darüber hinaus liefert die Hypophosphit-bedingte Reduktion der Wachstumsrate Auskunft, ob die FocA-Varianten in der Lage sind, das Formiat-Analogon in die Zelle aufzunehmen (vgl. Kammel *et al.*, 2021). Je stärker der Effekt auf das Zellwachstum ist, desto effizienter muss Hypophosphit über FocA bzw. entsprechende Varianten aufgenommen werden sein. Die Analyse der Hypophosphit-Sensitivität der mit verschiedenen FocA-Varianten komplementierten Stämme ist sehr aufschlussreich, da sich aufgrund der unterschiedlichen pK_a -Werte ($pK_a(\text{Formiat})$ 3,7 und $pK_a(\text{Hypophosphit})$ 1) der Anteil der un- bzw. dissoziierten Säure unterscheidet. Hypophosphit liegt also unter physiologischen Bedingungen fast ausschließlich als Ion vor und aus den Experimenten kann auf die mechanistische Bedeutung einer möglichen Protonierung des Ions beim Import geschlossen werden. Zudem ist es bei der Analyse der Formiat-Translokation oft nicht möglich dessen Efflux und Aufnahme genau voneinander abzugrenzen, da die Permeation und deren Direktionalität abhängig von der Wachstumsphase ist und in der Regel die intrazelluläre Formiat-Konzentration meist nur an einem Punkt der Wachstumskurve bestimmt wurde. Da Hypophosphit Enzyme wie PflB durch kovalente Bindung inhibiert (vgl. Abb. 5b bzw. Abschnitt 1.2.1), wird nur dessen Aufnahme untersucht.

Zusammengenommen ergeben die Ergebnisse diese vier Methoden ein differenziertes Bild, wie die FocA-abhängige Formiat-Permeation dessen cytosolische Konzentration reguliert (Abbildung 11). Durch das *in vivo* System werden weitere zelluläre Komponenten, welche regulatorische Funktionen übernehmen, berücksichtigt und insbesondere kann je nach verwendetem Stamm (*pflB* bzw. *pflA*-Mutanten) der Einfluss von aktivem oder inaktivem PflB analysiert werden. Mechanistische Details, die aus den Versuchen abgeleitet werden, sind somit für die Funktionsweise des Proteins im komplexen, zellulären System gültig.

2 Zielstellung

Im Rahmen dieser Dissertation sollte der Translokationsmechanismus der Formiat-Nitrit-Transporter am Beispiel des *E. coli* Formiat-Kanals FocA aufgeklärt werden. Der bidirektionale Transport von Formiat/Ameisensäure hat eine wesentliche Bedeutung für den anaeroben Metabolismus des Bakteriums, da Formiat als Effektormolekül viele weitere zelluläre Komponenten beeinflusst. Insbesondere die Wechselwirkung des Formiat-produzierenden Enzyms PflB mit dem *N*-Terminus von FocA ist von Interesse. Diese Interaktion sollte detaillierter untersucht werden, indem der Fokus auf die Identifikation wichtiger Aminosäuren bzw. strukturelle Motive im Bereich des FocA *N*-Terminus und der Evaluierung der Bedeutung von PflB für die bidirektionale Formiat-Translokation gelegt wurde.

Wie schon in Abschnitt 1.3.2 gezeigt, sind im Wesentlichen zwei Aminosäuren im zentralen Teil der Translokationspore sehr stark konserviert: Threonin 91 und Histidin 209. Für H209 wurde bereits eine Rolle in der Protonierung bzw. Deprotonierung des zu transportierenden Ions bei FNTs postuliert, dennoch beruhen viele Thesen ausschließlich auf *in silico* und elektrophysiologischen *in vitro* Analysen. Mithilfe der in 1.4 beschriebenen *in vivo* Methoden konnten alle wichtigen interagierenden bzw. regulierenden Zellkomponenten berücksichtigt werden, die möglicherweise Einfluss auf die Formiat- bzw. Ameisensäure-Konzentration in bzw. außerhalb der Zelle haben. Verschiedene bereits vorliegende oder neu etablierte *focA*, *pflB* und *pflA*-Mutanten wurden genutzt, um gezielter den Efflux von Formiat und davon komplett unabhängig dessen Influx zu beurteilen. Auf diese Weise sollten eine Vielzahl von FocA_{T91} und FocA_{H209}-Varianten bezüglich ihrer Transportaktivität verglichen werden und Rückschlüsse auf die Anforderung an die chemischen und sterischen Eigenschaften der Aminosäuren in der zentralen Translokationspore abgeleitet werden. Dies ermöglicht auch Unterschiede im Mechanismus je nach Transportrichtung aufzuklären. Kombinatorische Austausche der beiden Aminosäuren sollten Aussagen über die Notwendigkeit der Interaktion der Seitenketten über eine Wasserstoffbrückenbindung ermöglichen.

Aus der Gesamtheit der Daten der Translokationsaktivitäten verschiedener FocA-Varianten sollte abgeleitet werden, ob FocAs *N*-Terminus, T91 und H209 direkten Einfluss auf den Formiat-Transport haben und mögliche mechanistische Kontrollinstanzen darstellen. Final sollten Translokationsmechanismen für den Formiat-Efflux und -Influx vorgeschlagen werden und zudem wurde die Frage, ob FocA als klassischer Ionen-Kanal oder als Transporter einzuordnen ist, adressiert.

Kapitel 1 – Einfluss der *N*-terminalen FocA Domäne auf die Formiat-Translokation

- I) The soluble cytoplasmic *N*-terminal domain of the FocA channel gates bidirectional formate translocation – *Molecular Microbiology* 2021

Zusammenfassung Publikation I

Im Fokus dieser Publikation stand die Analyse des Einflusses der *N*-terminalen Region des *E. coli* Formiat-Kanals FocA auf die Permeation von Formiat/Ameisensäure. FNTs sind sich strukturell und auch in Hinblick auf ihre Primärsequenz sehr ähnlich. Der größte Unterschied liegt jedoch in dem durchschnittlich ca. 30 Aminosäure langen *N*-Terminus, der wenig bis keine konservierten Aminosäuren beinhaltet. In verschiedenen Interaktionsstudien konnte für FocA bereits gezeigt werden, dass dieser Proteinbereich mit dem Formiat-produzierenden Enzym Pyruvat Formiat-Lyase PflB interagiert. Es ist daher anzunehmen, dass sich die Formiat-Translokation von verschiedenen FocA-Varianten, welche Substitution in diesem Bereich tragen, unterscheidet.

In der Studie wurde eine Vielzahl von *N*-terminal verkürzten, einzelnen Aminosäure-Substitutionen enthaltenden und multiplen sowie sequentiellen Alanin-Austausch-aufweisenden FocA-Varianten erstellt und analysiert. Zunächst wurde bewiesen, dass die Varianten unter den Bedingungen der *in vivo* assays synthetisiert wurden und als homopentamere Membranproteine vorlagen. FocA-Varianten, denen ein Teil des oder der vollständige *N*-Terminus fehlte, waren jedoch deutlich instabiler als das native Protein. Im Rahmen von verschiedenen *in vivo* Experimenten (vgl. Abschnitt 1.4) bestätigte sich, dass der *N*-Terminus essentiell für den bidirektionalen FocA-abhängigen Formiat-Transport war. Weiterhin konnten wichtige Aminosäuremotive und Sekundärstrukturelemente identifiziert werden, die für den Formiat-Efflux bzw. Formiat- und Hypophosphit-Influx notwendig waren. Es zeigte sich, dass einzelne Substitution im proximalen Teil des *N*-Terminus den Efflux von Formiat mehr als 40 % reduzierten und wenn Aminosäuren im Bereich von Position 5 bis 11 (erste *N*-terminalen α -Helix) durch Alanin ausgetauscht wurden, fand in der exponentiellen Wachstumsphase kaum bis kein Formiat-Export statt. Die Bedeutung der ersten *N*-terminalen α -Helix konnte auch in Analysen der Wachstumsinhibition durch Hypophosphit bestätigt werden, da eine in diesem Bereich verkürzte Variante keine Sensitivität gegenüber dem toxischen Formiat-Analogen aufwies.

Anhand der Untersuchungen der Formiat-Translokation der FocA-Varianten in Anwesenheit von aktivem oder inaktivem PflB, sowie dessen Abwesenheit, konnte gezeigt werden, dass die Formiat und Hypophosphit-Aufnahme davon direkt beeinflusst waren. Weiterhin wurde geschlussfolgert, dass es unterschiedliche Mechanismen für den Formiat-Efflux und –Influx gibt und es wurde die Hypothese aufgestellt, dass der *N*-Terminus darauf einen essentiellen Einfluss hat und PflB als „gate-keeper“ den Formiat-Transport reguliert.

The soluble cytoplasmic N-terminal domain of the FocA channel gates bidirectional formate translocation

Michelle Kammel | Doreen Hunger | Robert Gary Sawers 

Institute of Microbiology, Martin-Luther University Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany

Correspondence

R. Gary Sawers, Institute of Microbiology, Martin-Luther University Halle-Wittenberg, Kurt-Mothes-Str. 3, 06120 Halle (Saale) Germany.
Email: gary.sawers@mikrobiologie.uni-halle.de

Present address

Doreen Hunger, IDT Biologika, Dessau-Roßlau, Germany

Funding information

Deutsche Forschungsgemeinschaft, Grant/Award Number: GRK1026

Abstract

FocA belongs to the pentameric FNT (formate-nitrite transporter) superfamily of anion channels, translocating formate bidirectionally across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* and other microorganisms. While the membrane-integral core of FocA shares considerable amino acid sequence conservation with other FNT family members, the soluble cytoplasmic N-terminal domain does not. To analyze the potential biochemical function of FocA's N-terminal domain in vivo, we constructed truncation derivatives and amino acid-exchange variants, and determined their ability to translocate formate across the membrane of *E. coli* cells by monitoring intracellular formate levels using a formate-sensitive reporter system. Analysis of strains synthesizing these FocA variants provided insights into formate efflux. Strains lacking the ability to generate formate intracellularly allowed us to determine whether these variants could import formate or its toxic chemical analog hypophosphite. Our findings reveal that the N-terminal domain of FocA is crucial for bidirectional FocA-dependent permeation of formate across the membrane. Moreover, we show that an amino acid sequence motif and secondary structural features of the flexible N-terminal domain are important for formate translocation, and efflux/influx is influenced by pyruvate formate-lyase. The soluble N-terminal domain is, therefore, essential for bidirectional formate translocation by FocA, suggesting a "gate-keeper" function controlling anion accessibility.

KEYWORDS

anion gating, FNT channel, formate permeation, hypophosphite-sensitivity, N-terminal domain

1 | INTRODUCTION

FNT (formate-nitrite transporter) channels represent a family of evolutionarily ancient membrane proteins that selectively permeate monovalent anions such as formate, nitrite, lactate, or hydrosulfide across cytoplasmic membranes (Lü et al., 2013; Waight et al., 2013). Phylogenomic analyses (Mukherjee et al., 2017; Saier et al., 1999) have shown that FNT

channels are widespread in Bacteria, Euryarchaeota, and in certain fungi, yeasts, and protists, including *Plasmodium* and *Toxoplasma* species. They are not present in higher Eukarya and they thus represent potentially important drug targets in pathogens (Gollack et al., 2017; Hapuarachchi et al., 2017). The first FNT to be identified and characterized as an anion channel was FocA of *Escherichia coli*, which bidirectionally translocates formate (Suppmann & Sawers, 1994). Significant advances were made in

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. Molecular Microbiology published by John Wiley & Sons Ltd

our understanding of these proteins around 10 years ago when detailed structural analyses of several FNT channels revealed that all have in common a homopentameric organization, with an overall fold that is structurally similar to aqua- and glyceroporins (Czyzewski & Wang, 2012; Lü et al., 2011, 2012b; Waight et al., 2010; Wang et al., 2009). Each monomer comprises 6 transmembrane helices (TM), two of which, helices 2 and 5, are broken centrally and fold to form a pore through the monomer. This substrate pore (Waight et al., 2010, 2013; Wang et al., 2009), which has an "hourglass" shape, includes a narrow passage bounded by hydrophobic cytoplasmic and periplasmic constriction sites, which are suggested to act as anion-selectivity filters (Lü et al., 2013; Waight et al., 2013). Molecular dynamic simulations (Atkovska & Hub, 2017; Lv et al., 2013), as well as structural analyses indicate that this pore does not allow passage of water and it is too hydrophobic to allow permeation of an anion, implying that undissociated formic acid is translocated through FocA. Access to the formate-selectivity filters is via funnel-like vestibules on the cytoplasmic and periplasmic sides of the membrane and a portion of the broken TM2 forms an Ω -loop that is inserted within the cytoplasmic funnel forming a "plug"-like structure restricting access to the narrow pore (Waight et al., 2013). The tip of the Ω -loop includes a highly conserved threonyl residue that forms a hydrogen-bond with a conserved histidinyl residue, which closes the narrow hydrophobic pore. Together, the Ω -loop and the histidinyl residue have been proposed to "gate" access of the anion to the pore. How this gate is opened and closed, however, is still unresolved, but it has been suggested (Waight et al., 2013) that protonation of the central histidinyl residue would release the hydrogen-bonded Thr and cause movement of the Ω -loop out of the cytoplasmic vestibule and some structures of FocA support this model (Lü et al., 2011). This model would also be in accord with the pH-sensitivity of FocA, whereby at pH above 6.5 formate is translocated out of the cytoplasm and at a pH below 6.5, formate is imported into the cell (Lü et al., 2011; Suppmann & Sawers, 1994; Wang et al., 2009). The problem with this model is that, unlike FocA, the NirC (nitrite reduction protein C) and HSC (hydrosulfide ion channel) membrane channels show no evidence of pH-sensitive anion translocation, yet, they also possess the conserved His and Thr residues (Czyzewski & Wang, 2012; Lü et al., 2012b). This suggests that FNT channels might have a second gating mechanism to move the Ω -loop out of the cytoplasmic vestibule.

While the six membrane-integral TMs of each FNT monomer exhibit an overall conservation at the primary through quaternary structural levels (Hunger et al., 2017; Lü et al., 2013; Waight et al., 2013), the soluble N-terminal domain of these proteins exhibits only very limited similarity between different family members, both in terms of length and amino acid sequence (Figure 1a). For example, the N-terminal domain of FocA from *E. coli* is around 31 amino acid residues in length, while the same domain of NirC from *E. coli* and that of HSC from *Clostridioides difficile* are only 23–24 residues in length; and some of these N-terminal domains are even shorter (Mukherjee et al., 2017). A common general feature of these soluble N-terminal domains, however, is that they include short α -helices, which in the case of NirC and HSC are found to lie parallel to the membrane (Czyzewski & Wang, 2012; Lü et al., 2012), forming a rigid structure near the entrance to the cytoplasmic vestibule of the pore. Because the N-terminal domain of these proteins can contact TM2b,

and thus, influence the position within the vestibule of the Ω -loop, it has been suggested (Czyzewski & Wang, 2012; Waight et al., 2013; Figure 1b) that the N-terminal domain might modulate formate accessibility to the pore. Indeed, the initial structure of FocA from *E. coli* was obtained with a protein lacking the first 21 amino acid residues of the N-terminal domain and all five pores in this structure were in the closed conformation (Wang et al., 2009). Together, these structural analyses suggest one of two functions for the N-terminal domain; either it acts as an anchor to stabilize the core of the protein in the membrane, or it functions as an interaction platform for a cytoplasmic protein(s) that might control opening and closing of the pore. We have previously shown using combined in vitro chemical cross-linking and high-resolution mass spectrometry that the cytoplasmic enzyme pyruvate formate-lyase (PflB) of *E. coli* interacts specifically with FocA, with the majority of cross-links occurring at the N-terminal domain (Doberenz et al., 2014). Moreover, PflB, which exists in conformationally different active and inactive forms (Knappe & Sawers, 1990; Peng et al., 2010), generates the substrate for FocA; the *focA* and *pflB* genes are also adjacent and co-expressed on the *E. coli* chromosome (Sawers & Böck, 1989). Notably, the genes encoding several other FNTs, such as NirC, FdhC (formate dehydrogenase channel C), and HSC, are located adjacent, or in proximity, to genes encoding the enzymes that generate their respective anion substrates (Czyzewski & Wang, 2012; Peakman et al., 1990; White & Ferry, 1992). This might suggest that perhaps an interaction between the FNT channel and an enzyme that generates its cognate substrate could also be considered for other systems. Nevertheless, in vivo data in support of such an hypothesis are currently only circumstantial.

Studying FNT channel function in vivo is inherently difficult due to the biochemistry of these proteins and the lack of a suitable assay system to monitor accurately and quantitatively monovalent anion permeation in whole cells. Nevertheless, some progress has been made by studying FocA in its homologous host (Beyer et al., 2013; Hunger et al., 2014, 2017; Suppmann & Sawers, 1994) and FocA and other FNTs in heterologous systems such as yeast (Erler et al., 2018; Wiechert & Beitz, 2017), which do not have FNT channels. In vitro studies using electrophysiology of isolated FNT channels (Lü et al., 2011, 2012b) have revealed that the proteins show poly-specificity with regard to anion permeation, leading to the suggestion that enterobacterial FocA translocates the anionic products of mixed-acid fermentation out of the cell (Lü et al., 2012a). This contradicts physiological studies for FocA in *E. coli*, however, which indicate that FocA is specific for the bidirectional permeation of formate (Beyer et al., 2013; Hunger et al., 2014, 2017; Suppmann & Sawers, 1994). Hence, both in vitro and heterologous expression studies might be potentially limited by the inherent absence of the natural physiological and biochemical environment in which these proteins function. In this study, we present evidence that the N-terminal domain of FocA from *E. coli* is essential for bidirectional permeation of formate, and indeed for uptake of the toxic formate analog hypophosphite. Together, our data suggest different mechanisms for formate efflux and influx and that the N-terminal domain, along with PflB, might have a role in gating formate access. Data obtained using N-terminally truncated derivatives are also consistent with a role of the N-terminal domain in stabilizing FocA in the membrane. To our knowledge, this

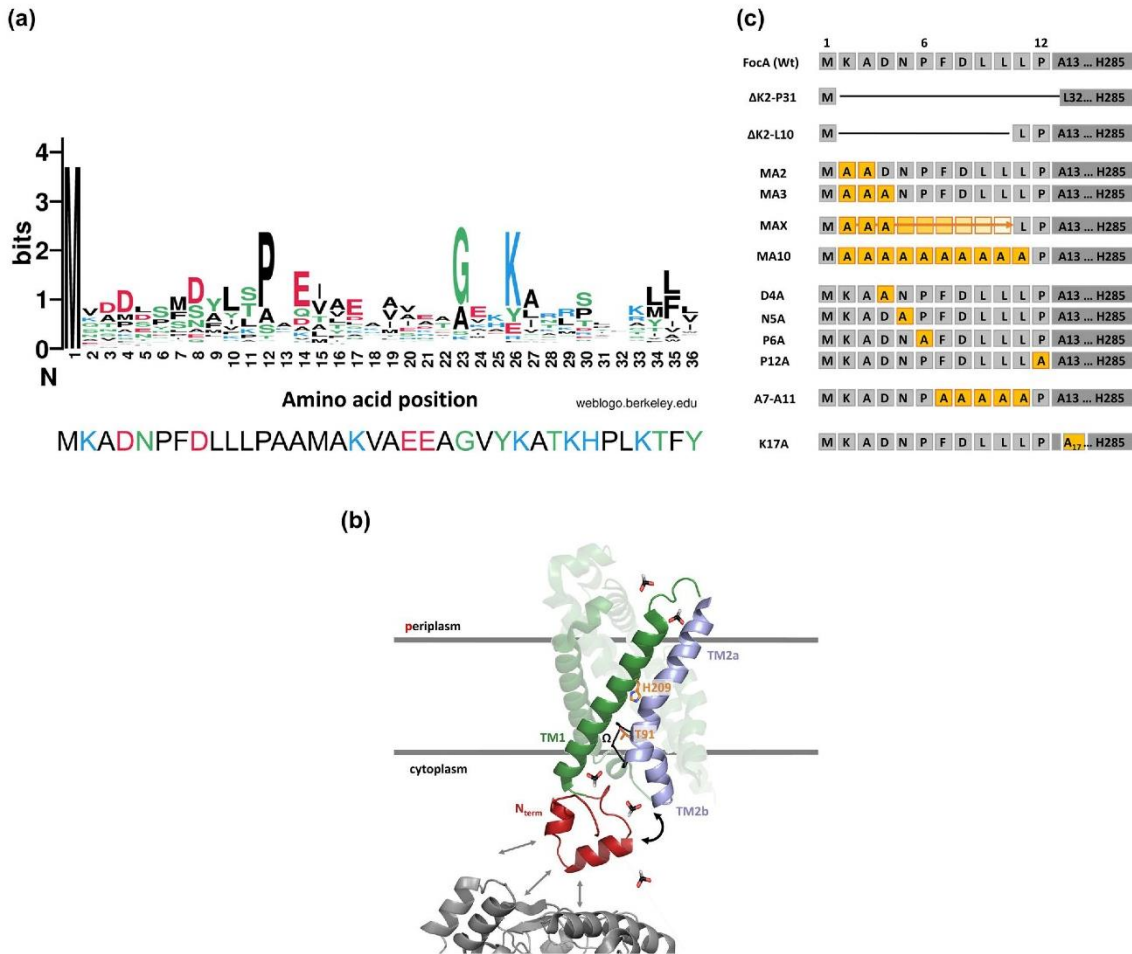


FIGURE 1 Amino acid residues of the N-terminal domain of FocA. (a) Conservation plot comparing the first 36 N-terminal amino acid residues from 258 FNT channels using the WebLogo 3 stacking algorithm (Crooks et al., 2004). Amino acids displayed in black possess an unpolarside chain (A, F, I, L, M, V, W) and polar side chains are indicated in green (G, S, T, N, Q, Y). Acidic amino acids are shown in red (D, E) and alkaline residues in blue (H, K, R). The plot is with reference to the amino acid sequence of the N-terminal region of native FocA from *E. coli*, the sequence of which is presented below the plot. (b) Schematic representation of a single FocA monomer in the membrane (green and blue, pdb 3KCU, amino acids 29–285) illustrating how the N-terminal domain (red, de novo modeled by PEP-FOLD 3.5, amino acids 1–28) might control the conformational change of the Ω -loop (black) through contacting the transmembrane helix TM2b (light blue). Permeation of formate ions across the cytoplasmic membrane is shown schematically. Residues essential for the translocation mechanism, His209 and Thr91, are highlighted in orange. Interaction of FocA's N-terminal domain with PfIB (gray, pdb 1H18) is shown at the bottom left. (c) Scheme depicting representative examples of amino acid exchanges/deletions introduced into the N-terminal domain of FocA variants and their corresponding nomenclature. The X and the horizontal arrow (row labeled MAX) indicate successive exchanges MA4 through MA9

study presents the first in vivo data suggesting that a soluble N-terminal domain of an anion channel is involved in mediating anion permeation.

2 | RESULTS

2.1 | N-terminally truncated FocA variants are impaired in formate efflux

In order to examine the functional significance of the soluble, cytoplasmically oriented, N-terminal domain of FocA on formate

translocation, we made use of a single-copy *fdhF_p::lacZ* reporter, which responds to changes in the intracellular formate concentration (Beyer et al., 2013; Hunger et al., 2014). The wild-type strain DH4100 grown anaerobically in M9-glucose medium produced formate from pyruvate and had a β -galactosidase enzyme activity of ~580 Miller units (Figure 2a). Under the same growth conditions, strain DH201 (Δ *pfIB*), which lacks the enzyme pyruvate formate-lyase (PflB), has a β -galactosidase enzyme activity of less than 10 units. Strain DH701 (*focA*) cannot synthesize the formate channel FocA, and thus, accumulates formate intracellularly when compared with wild type, resulting in an increased β -galactosidase enzyme activity of ~700 Miller units

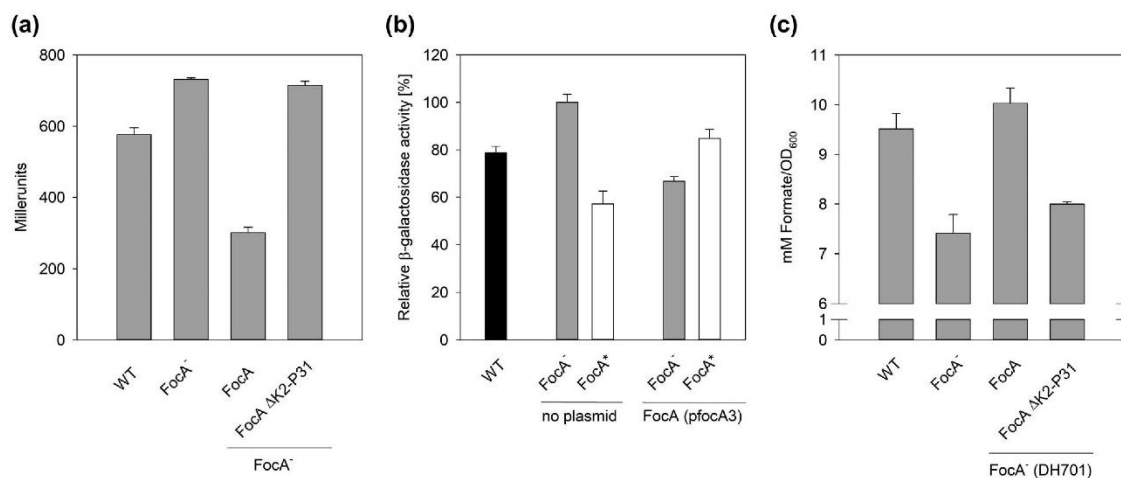


FIGURE 2 The soluble N-terminal domain of FocA is essential for formate efflux. β -galactosidase enzyme activities are shown after anaerobic growth in glucose-minimal medium (see Experimental procedures). (a) The *focA* mutant DH701 (FocA⁻) transformed with a plasmid carrying a *focA* gene encoding either C-terminally strep-tagged native FocA (pfcA3) or a variant lacking amino acid residues 2 through 31 (FocA Δ K2-P31) was analyzed. WT = DH4100. (b) The indicated strains were analyzed either without or after transformation with plasmid pfcA3, encoding strep-tagged native FocA. WT, DH4100 (black histogram); FocA⁻, DH701 (*focA*) (gray histogram); FocA⁺, DH702 (FocA overproduced; white histogram) were measured without a plasmid, or after transformation with pfcA3. About 100% β -galactosidase enzyme activity was determined for strain DH701 to be 620 ± 21 Miller units. (c) The concentration of formate in the culture medium after anaerobic growth in glucose-minimal medium was determined by HPLC analysis (see Experimental procedures) for the indicated strains. WT, DH4100; FocA⁻, DH701 (*focA*); FocA⁻/FocA, DH701/pfcA3; FocA⁻/FocA Δ K2P31, DH701/pfcA Δ K2P31. All experiments were performed with minimally three biological replicates, each assay performed in triplicate

relative to the wild-type strain DH4100 (Figure 2a). Synthesis of the native FocA protein with a C-terminal strep-tag, encoded on plasmid pfcA3 (Table S2), in strain DH701 lowered intracellular formate levels compared to the FocA-free strain, which is reflected in an approximate 2.5-fold reduction in β -galactosidase enzyme activity after anaerobic fermentative growth (Figure 2a). Increasing the abundance of FocA 10- to 20-fold by converting the GUG translation initiation codon of single-copy *focA* to the more efficient AUG (Suppmann & Sawers, 1994; see also Figure 2b) in strain DH702 does not significantly impact the formate export kinetics (Suppmann & Sawers, 1994) or the formate-dependent β -galactosidase enzyme activity (Figure 2b); introduction of pfcA3 carrying the *focA* gene encoding C-terminally strep-tagged FocA into DH702 caused only an approximate 20% increase in *fdhF_p::lacZ* expression. This result indicates that the amount of FocA in the anaerobic cell does not limit formate translocation, but at the same time indicates that increasing the abundance of the protein does not significantly affect formate efflux (Beyer et al., 2013; Suppmann & Sawers, 1994). This is consistent with the protein having a channel function, and validates the use of plasmid-borne *focA* expression to examine the effects of amino acid exchanges on translocation activity in vivo. Moreover, the presence of these plasmids in DH701 had no impact on the levels of PflB, the enzyme that synthesizes formate during anaerobic growth (Figure S1).

In an initial experiment to analyze whether the soluble, cytoplasmic domain of FocA is important for FocA function, a plasmid carrying a modified *focA* gene encoding FocA variant (FocA Δ K2-P31) that lacked the complete N-terminal domain (removal of amino acid

residues K2-P31; Figure 1c) was constructed. Introduction of pfcA Δ K2-P31, whose modified *focA* gene encodes FocA Δ K2-P31, into strain DH701 (*focA*) failed to result in a significant reduction in β -galactosidase enzyme activity compared to the enzyme activity measured in DH701, and by extension intracellular formate levels, to the levels observed when plasmid-encoded native FocA was introduced into the strain (Figure 2a). This suggests that this truncated FocA variant is impaired in formate efflux.

To examine whether removal of the N-terminal domain indeed affected formate efflux by FocA, we determined the formate concentration in the medium after fermentative growth to the late exponential phase ($OD_{600} = 0.8$) (Figure 2c). The results show that strain DH701 (*focA*) exported approximately 20%–25% less formate compared with the wild-type strain DH4100 and DH701 transformed with pfcA3. Introduction of plasmid pfcA Δ K2-P31 into DH701 revealed formate levels in the growth medium were in a range similar to those of the *focA* mutant, supporting the notion that formate export is impaired in a FocA variant lacking the N-terminus. Note that there is minimally one further, as yet unidentified, system present in *E. coli* that can translocate formate (Suppmann & Sawers, 1994). NirC can be ruled out as the unidentified formate channel/transporter because a *focA-nirC* double-null mutant retains the formate-translocating capability of a *focA* mutant (Beyer et al., 2013; Suppmann, 1993). Together, these results reveal an inverse relationship between intracellular β -galactosidase activities and extracellular formate concentration, and are consistent with the N-terminally truncated FocA derivative being impaired in formate efflux.

2.2 | N-terminal truncation variants are synthesized but are less stable than native FocA

To analyze whether the truncated FocA Δ K2-P31 variant formed membrane-integral homopentamers, which is characteristic for the wild-type FocA protein (Falke et al., 2010; Hunger et al., 2017), a C-terminally strep-tagged variant of FocA Δ K2-P31 was purified (see Experimental procedures) and electrophoretically separated in SDS- and BN- (blue-native) PAGE (Figure 3a,b). SDS-PAGE revealed that native, strep-tagged FocA migrated with a molecular mass of approximately 23 kDa, despite the deduced molecular mass of the protein being 32.2 kDa with the strep-tag, as has been previously reported (Falke et al., 2010), while the N-terminally truncated FocA Δ K2-P31 variant migrated slightly faster (Figure 3a), consistent with the reduction in the length of FocA by 30 amino acid residues (deduced mass of monomer = 29.01 kDa with a tag). Importantly, both proteins migrated in BN-PAGE as pentamers, albeit FocA Δ K2-P31 (deduced mass of strep-tagged pentamer = 145.1 kDa) migrated slightly faster than the native, recombinant protein (deduced mass of strep-tagged pentamer = 161 kDa) (Figure 3b). A further N-terminally truncated derivative of FocA, FocA Δ K2-L10, was constructed (Figure 1c) and a strep-tagged variant of this protein was also purified and analyzed by BN-PAGE (Figure 3b). The protein migrated like FocA Δ K2-P31 as a homopentamer. When a plasmid encoding FocA Δ K2-L10 (Figure 1c) was introduced into DH701 β -galactosidase activity was recorded as 648 Miller units, indicating that it was also impaired in formate efflux.

While approximately 0.6 mg of native strep-tagged FocA was isolated per L of culture, in comparison, only 0.2 mg/L of FocA Δ K2-P31 and 0.1 mg/L of FocA Δ K2-L10 was isolated, suggesting that the truncated variants are less stable, or less efficiently inserted into the membrane, than the full-length protein. In order to test this, membrane fractions isolated from strains DH4100 (wild type), DH701/pfocA3, and DH701/pfocA Δ K2-P31 were separated by SDS-PAGE and treated with anti-FocA antibodies in a western blot (Figure S2a). The blot revealed that FocA encoded by the recombinant *focA* gene on pfocA3 migrated with a mass of approximately 24 kDa in the Tris-tricine gel system. The level of wild type, chromosomally encoded FocA in DH4100 was significantly lower and migrated slightly faster than the strep-tagged recombinant protein, which has also been reported previously (Falke et al., 2010; Hunger et al., 2017). In contrast, the truncated variant FocA Δ K2-P31 could not be detected after growth in glucose-minimal medium. Note that the weak band observed in an extract from DH701 (*focA*), and which migrated slightly above FocA in the Tris-tricine gel system (Figure S2a), is a cross-reacting polypeptide of unknown origin that occasionally obscures the migration position of FocA (Falke et al., 2010). In standard SDS-PAGE analysis, this cross-reacting species migrates slightly faster than native, untagged FocA, for example, in strain DH702 (Figure S2b). In order to demonstrate that FocA Δ K2-P31 was indeed synthesized, *focA* gene expression was induced with anhydrotetracycline (AHT) and analysis of membrane fractions

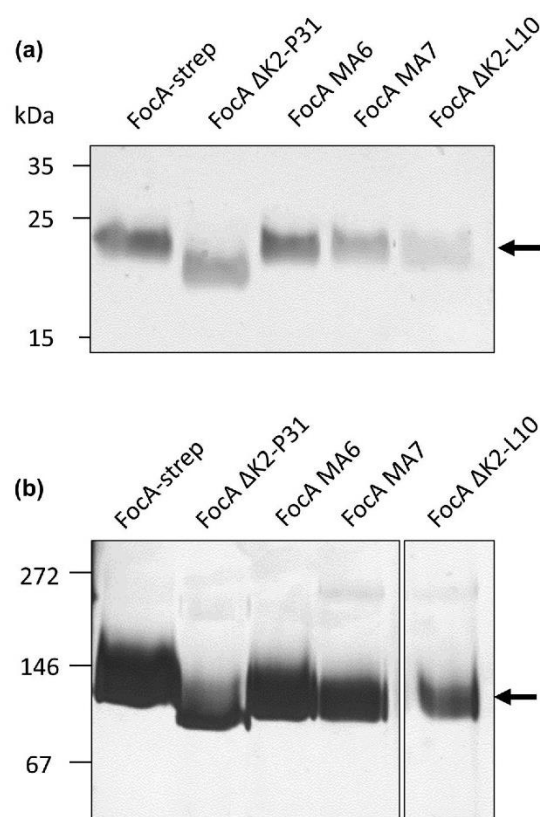


FIGURE 3 Both the amino acid-exchange variants and truncated derivatives in the N-terminal domain of FocA form homopentamers. (a) Shown is a silver-stained SDS-PAGE (12.5% w/v polyacrylamide) in which the indicated purified FocA variants (1 μ g of protein) were electrophoretically separated. The migration position of a FocA monomer is displayed on the right with an arrow and migration positions of molecular mass markers (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) in kDa are indicated on the left of the figure. (b) The same purified FocA variants (1 μ g of protein) were separated in BN-PAGE employing a 4%–16% (w/v) polyacrylamide gradient. After electrophoretic separation, the gel was silver-stained and the migration position of a FocA pentamer (~140 kDa) is indicated with an arrow on the right and the migration positions of molecular mass markers (Serva) are shown on the left. The native markers include jack bean urease (272 kDa), porcine lactate dehydrogenase (146 kDa), and bovine serum albumin (67 kDa)

from these cells by western blotting revealed clearly the presence of FocA Δ K2-P31 (Figure S2a). As a further control, we determined β -galactosidase enzyme activity of DH701/pfocA Δ K2-P31 with and without AHT treatment and could show that even after strongly enhanced synthesis of the truncation derivative, no significant change in β -galactosidase activity compared with the *focA* mutant DH701 was detected in the presence of AHT (Figure S3a). In the absence of AHT, β -galactosidase enzyme activity of strain DH701/pfocA Δ K2-P31 increased approximately 40% when compared with DH701 (*focA*), which presumably was due to the

strongly increased abundance of the protein. Note that these cultures were grown to the early stationary phase and this is why the level of *fdhF_p::lacZ* gene expression, measured as β -galactosidase enzyme activity, was lower than in exponentially growing cells.

Together, these data demonstrate that the N-terminally truncated variants, when expressed from a plasmid, are synthesized in lower amounts compared with the full length, recombinant protein, but they nevertheless form membrane-integral homopentamers like the native FocA protein.

2.3 | Identification of amino acid residues in the N-terminal domain critical for formate translocation

To facilitate the construction of amino acid variants of FocA, we performed the experiments with C-terminally strep-tagged FocA proteins throughout this study. To demonstrate that addition of a C-terminal strep-tag had no influence on the function of FocA *in vivo*, we determined β -galactosidase enzyme activity after anaerobic growth of strain DH701 (*focA*) transformed with plasmids encoding native FocA with and without a C-terminal strep-tag, as well as FocA Δ K2-P31 with and without a strep-tag, and in no case was any significant effect of the strep-tag on β -galactosidase enzyme activity noted (Figure S3b).

Having determined that FocA Δ K2-L10 has a similar phenotype regarding formate translocation as FocA Δ K2-P31 in DH701 (see above), we next substituted the amino acid residues 2 through 11 completely with alanyl residues (construct FocAMA10, Figure 1c). This FocA variant was introduced into strain DH701 and β -galactosidase enzyme activity after anaerobic growth in minimal medium with glucose was determined (Figure 4). The results showed that this amino acid variant had an enzyme activity that was around 90% the level of that of the *focA* mutant DH701, indicating that this variant was also impaired in formate efflux, despite having a full-length N-terminal domain (Figure 4).

The alanyl-residue substitutions in this derivative were successively changed back to the respective original amino acid residue

(see Figure 1c) and β -galactosidase enzyme activity of DH701 transformed with the cognate plasmid was determined (Figure 4). The results revealed that none could restore β -galactosidase enzyme activity to a level like that of recombinant FocA, with the exception of the FocAMA2 variant, which had a single amino acid substitution of K2A. The variant FocAMA3 (exchanges of K2-D4 to A; Figure 1c) restored approximately 33% less β -galactosidase activity when compared to the level measured for native, recombinant FocA in DH701 (Figure 4). Successive introduction of further alanyl residues resulted in progressive loss of the ability of the protein to efflux formate, and variants MA4 (exchanges of K2-N5 to A) through MA7 (exchanges of K2-D8 to A) were essentially inactive. Surprisingly, however, the FocAMA8 variant, in which residues 2 through 9 were exchanged for Ala, had approximately 50% of the β -galactosidase activity compared with that measured in DH701/pfocA3 (Figure 4). The sinusoidal variation in the activities measured for the different variants suggested that both primary and secondary structural changes might be responsible for these effects. These FocA variants were synthesized and formed pentameric, membrane-integral proteins as shown exemplarily for variants FocAMA6 and FocAMA7 (Figure 3).

Despite lack of a clear consensus sequence in the N-terminal domain of FocA when compared with other FNT proteins (see Figure 1a), with the possible exception of the prolyl residue at amino acid position 12, the alanyl-residue substitution data nonetheless suggested that perturbation of the sequence at the N-terminus of the protein caused a significant impairment of formate-translocation activity. We therefore decided to introduce single amino acid exchanges in potential key residues and constructed FocAD4A, FocAN5A, FocAP6A, and FocAP12A variants (see Figure 1c). After transformation of the cognate plasmid into strain DH701 and anaerobic cultivation, the impact of these exchanges on β -galactosidase enzyme activity was investigated (Figure 4). The D4A substitution reduced the enzyme activity of the variant in DH701 (*focA*) only by approximately 20% compared with

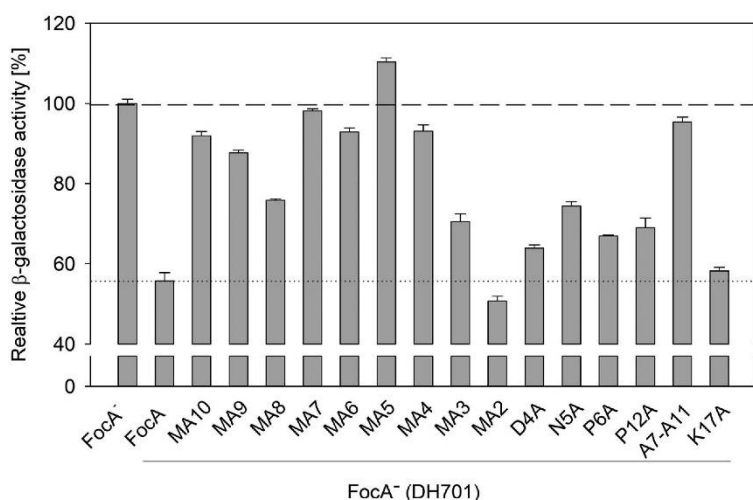


FIGURE 4 Expression of the formate-dependent *fdhF_p::lacZ* reporter in *focA* mutant DH701 synthesizing various amino acid-exchange variants of FocA. Shown are the relative β -galactosidase enzyme activities of strain DH701 (*focA*) transformed with plasmids carrying genes encoding the indicated FocA derivatives after anaerobic growth in glucose-minimal medium. FocA⁻ = DH701. The dashed line in the diagram indicates 100% activity, which is equivalent to 616 ± 19 Miller units, while the dotted line signifies the activity determined for DH701 transformed with pfocA3

type, recombinant *focA* gene on *pfocA3* resulted in an approximate 65% decrease in the growth rate (i.e., increased sensitivity) in the presence of the formate analog (Figure 6). This result suggests that FocA takes up hypophosphite at a sufficient concentration for the anion to be able to target a further, unidentified hypophosphite-sensitive enzyme activity in anaerobically growing *E. coli*. Notably, both N-terminal truncation derivatives of FocA were resistant to hypophosphite, indicating that without a complete N-terminal domain, the protein is unable to translocate either hypophosphite or formate into the cell.

Introduction of the poly-alanine tract from residue 2 through 11 into FocA (FocAMA10, Figure 1c) resulted in a β -galactosidase enzyme activity that was 35% lower than that of the original strain DH601 lacking FocA (Figure 6). This unexpected result suggests that this FocA variant is not only unable to import formate, but also appears to have an enhanced efflux capability in this genetic background. Strikingly, a similar activity was observed for FocAMA9 (Figure 6). Both variants showed a low formate-efflux capability when synthesized in DH701, which has an active form of PflB (cf. Figure 4). Residual β -galactosidase enzyme activity, amounting to roughly 25% of the wild-type level, was measured for derivatives FocAMA8 through FocAMA5 and for FocAMA2, while FocAMA4 and FocAMA3 were inactive. Together with the observation that the FocAD4A single amino acid substitution variant showed wild-type β -galactosidase activity (Figure 6), these findings indicate that amino acid residue K2 is important for formate uptake when PflB is in its inactive form. The P6A, P12A, and K17A exchange variants of FocA also exhibited wild-type or near wild-type β -galactosidase enzyme activity (Figure 6), suggesting unimpaired formate import capacity. Only the FocAN5A variant had a clearly reduced β -galactosidase activity, again emphasizing the importance of this residue for FocA function.

Remarkably, exchange of the residues 7 through 11 with a penta-alanine tract did not abolish formate import activity, with a retention of approximately 67% of the wild-type activity (Figure 6). This result indicates that the KADNP motif between residues 2 and 6, in particular residue N5, in the N-terminal domain is important for formate influx in DH601 (PflB is in its inactive form). This motif is, however, insufficient on its own to facilitate formate efflux when PflB is active (in strain DH701), and in this case the leucyl residues at positions 10 and 11 also appear to be important. Together, these results indicate that in a strain synthesizing inactive PflB, the N-terminal residues K2 and N5 are both particularly important for formate uptake by FocA. However, they seem to play a less important, secondary, role in formate efflux. Thus, conformational organization of this region appears to have an overriding effect when PflB is in its enzymatically active state. Moreover, these results clearly indicate a difference in mechanism between efflux and influx of formate.

Analysis of the sensitivity toward hypophosphite of DH601 synthesizing the different variants of FocA revealed that, while anaerobic growth of DH601 was essentially unaffected by the presence of 10 mM sodium hypophosphite, introduction of the wild-type *focA*

gene restored clear sensitivity toward the formate analog (Figure S4). Notably, both of the N-terminal truncation variants of FocA, as well as all poly-alanine substitution variants were resistant to hypophosphite, which indicates hypophosphite is not imported and more or less reflects the findings with regard to formate uptake. On the contrary, the D4A, P6A, P12A, and K17A variants all showed wild-type sensitivity to hypophosphite (Figure S4). Remarkably, however, the FocAA7-A11 variant was also strongly impaired in hypophosphite uptake, which contrasts the ability of this derivative to perform formate influx. This suggests that the residues between F7 and L11, and their impact on the overall structure of FocA's N-terminal domain, play a decisive role in hypophosphite uptake but are less crucial for formate uptake. The effects of hypophosphite on growth of DH701 and DH601 synthesizing the different FocA variants are summarized in Table S1.

2.6 | Influence of amino acid exchanges in the N-terminal domain of FocA in a strain completely lacking PflB

Several of the amino acid-exchange variants were also tested for their ability to translocate formate into a strain that lacked the gene encoding PflB, strain DH201 $\Delta(focA\ pflB)$ (Figure S5; Sawers & Böck, 1988). This strain was tested because it lacks PflB and, because previous results revealed that PflB can interact with the N-terminal domain of FocA (Doberenz et al., 2014), we wished to determine whether there was a difference in formate uptake between a strain that has no PflB enzyme and one that synthesizes an inactive PflB enzyme. Truncation of, or introduction of poly-alanyl residues into, the N-terminal domain of FocA inactivated the protein with respect to formate import activity. In contrast, the variant FocAD4A (exchange of Asp at position 4 to Ala), when introduced into DH201, caused an approximate 125% increase in β -galactosidase enzyme activity when compared with the activity of the original strain DH201 ($\Delta focA\ \Delta pflB$) (Figure S5). A similar increase in β -galactosidase enzyme activity was measured when *pfocA3* was introduced into DH201 and this activity was also similar to that determined for the *E. coli* parental strain DH4100 (Figure S5). Exchanging the asparaginyl residue at position 5 for an alanyl residue (variant FocAN5A in Figure 1c) resulted in a β -galactosidase enzyme activity that was 25% lower than that of strain DH201 (Figure S5). This suggests not only that this FocA variant is impaired in formate uptake, but also that in the absence of PflB, this FocA variant preferentially translocates formate out of the cell. Moreover, while the P6A variant retained 45% of the formate influx capability when compared with native, recombinant FocA (DH201/*pfocA3*), the P12A FocA variant had an activity phenotype like that of the N5A variant (Figure S5). Together, these data indicate that despite the absence of PflB in strain DH201, native, recombinant FocA can still take up formate; however, this uptake is still dependent on the N-terminal domain. Furthermore, all amino acid residue exchanges in the N-terminal domain, except Asp at position

4, resulted in loss of formate uptake capability, while exchanges of the N5 and P12 residues resulted in even lower β -galactosidase enzyme activity than the original strain, suggesting increased efflux of formate. These results are consistent with active and inactive forms of PflB, and possibly also TdcE (Falke et al., 2016), having a role in regulating formate translocation through FocA.

3 | DISCUSSION

The apparent lack of conservation, both in length and amino acid sequence, of the soluble N-terminal domain is a striking feature within the FNT channel family (Figure 1a). Even when the N-terminal domain from FocA proteins within key genera of proteobacteria and Gram-positives are compared, this also reveals considerable variation in amino acid sequence conservation and domain length, the exception being the prolyl residue at amino acid position 12 in the first half of the domain in *E. coli* FocA (Figure S6). The general lack of conservation notwithstanding, the results of this study provide the first insights into the importance of this soluble N-terminal domain in modulating bidirectional formate permeation through the FocA pentamer's pores. Defining the precise length of the N-terminal domain of FNT proteins is made more difficult by the often poorly defined structure of the soluble domain (Wang et al., 2009). However, structural analysis of the well-defined α -helical N-terminal domain of the hydrosulfide ion channel HSC of *C. difficile* (Czyzewski & Wang, 2012) helped pinpoint the first amino acid of the TM1 helix in FocA to be near Leu31 (Figure 1a). Removal of this 31 amino acid residue long N-terminal domain of FocA revealed that it is essential to allow formate to pass through the pore, in either direction. Although no function has yet been ascribed to the soluble N-terminal domain of any FNT protein, structural analysis of several of these proteins has suggested that this domain might have a role in providing a support that moves TM2b and the associated Ω -loop into the cytoplasmic vestibule, consequently closing the pore (Czyzewski & Wang, 2012; Lü et al., 2011; Waight et al., 2013). The observation that diffracting crystals of *E. coli* FocA could only be obtained after removal of the first 22 amino acid residues of the N-terminal domain, and that all pores within the structure that was ultimately obtained were in the closed conformation (Wang et al., 2009), supports the hypothesis that the N-terminal domain might function to modulate pore access. A further FocA structure was subsequently obtained with a full-length protein (Lü et al., 2011) and revealed a mix of open and closed pores, which had different orientations of the N-terminal domain. These structural analyses support the proposed function of the N-terminal domain in "gating" the channel within FNT proteins by controlling the position of the associated Ω -loop (Figure 1b). Analysis of the N-terminal amino acid residue-exchange variants of FocA constructed in this study, which do not perturb the domain's length, clearly demonstrates that both the secondary structure and certain amino acid residues of this soluble domain have key biochemical functions in vivo, possibly even directly controlling the direction of formate permeation. The question that remains to be addressed in future studies is how this biochemical control is achieved.

The truncation variant of FocA lacking the complete N-terminal domain could be purified from the membrane fraction and was shown to form pentamers. Nevertheless, it was clearly synthesized in lower amounts than the native, full-length protein. This is reminiscent of the consequence of truncation of the C-terminus of FocA on membrane integration (Hunger et al., 2017), particularly when the truncation impinged upon the integrity of the TM, and suggests that the removal of key hydrophilic residues prevents the helix being stably anchored within the membrane. Nonetheless, because a similar phenotype, with respect to impaired formate permeation, was also observed when only the first 10 N-terminal amino acid residues of FocA were removed, this might actually suggest that certain sequence requirements govern or affect either protein synthesis or turnover, membrane-insertion, or indeed the function of the protein, and thus, cause lowering of its stability when they are removed.

To obviate the potential destabilization of FocA by decreasing the length of the N-terminal domain, we decided initially to replace the missing amino acid residues from positions 2 to 11 with a poly-alanine tract. The length of this protein was thus similar to the native protein but, although readily purified, it also exhibited reduced levels in the membrane. Most importantly, however, this protein was also inactive in bidirectional formate permeation. Only when almost all of the original amino acid residues were restored, could formate efflux by the FocA variant be recovered. Using a combination of experimental and molecular biological approaches, we could show that a motif (KADNP) at the immediate N-terminus (Figure 1b) of FocA appears to be important for the ability of the *E. coli* protein to permeate formate bidirectionally; the asparaginyl residue at position 5 is particularly important. However, our data also suggest that the overall structure of the N-terminal domain appears to be important for FocA function in vivo.

Using the Pep-fold algorithm it can be predicted that the first 36 N-terminal amino acids of *E. coli* FocA fold to form two short α -helices separated by a loop, and with a flexible N-terminus (Figure 7); a superposition of four structural models for this domain are shown in Figure S7. It is clear from these conformational predictions that the N-terminal domain is highly flexible, which is in agreement with earlier findings (Wang et al., 2009). Changing the residues from position 2 to 11 to alanines (FocAM10A) causes complete distortion of the predicted structure of the domain and significantly alters the orientation of the N-terminal amino acids (Figure 7b), which correlates with loss of formate-translocation capacity of the FocAMA10 variant. Structural predictions performed using the Pep-fold algorithm of the other N-terminal variants emphasizes how small sequence changes can have a significant effect on the predicted secondary structure of the domain (Figure S8), which again correlates with the significant effects observed for these proteins on formate efflux and influx. Whether these hypothetical structural changes effect changes in the position of the Ω -loop or interaction with PflB will require further detailed study. Notably, reintroduction of the KADNP residues to the poly-alanyl variant restores the helices to the predicted structure (Figure 7b), and this also correlates with recovery of the ability of the variant to take up formate (see Figure 6). However, this does not explain why translocation

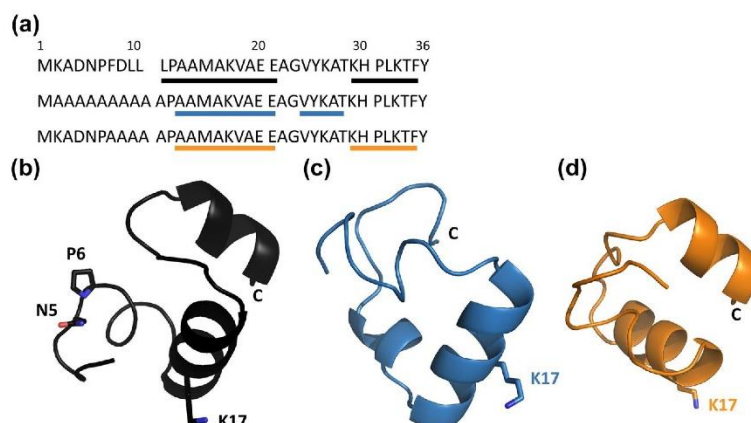


FIGURE 7 Comparison of a selection of predicted conformational models of the N-terminal domain of FocA. (a) The amino acid sequence of the first 36 residues of wild-type FocA (top), the FocAMA10 variant (middle), and FocAA7-L11 variant (bottom) are aligned. The bars below each sequence indicate locations of α -helical structure in the respective domains, as predicted using the Pep-fold 3.5 algorithm. (b). The predicted structural model of the 36 amino acid-long N-terminal sequence of wild-type FocA is shown. Those for FocAMA10 (c) and FocAA7-L11 (d) are displayed side-by-side. In each structural representation the C-terminal portion of the peptide was fixed in the upper right-hand quadrant of the depiction. Amino acid residues N5, P6, and K17 are shown for orientation purposes. The colors correlate with the sequences in part A

of formate functions only in the influx direction and only when PflB is inactive (cf. Figures 4 and 6).

3.1 | How might the N-terminal domain function to gate the FocA pore?

A recent cryo-electron microscopy-based structural analysis of a calcium-gated potassium channel (Fan et al., 2020) demonstrated that when its N-terminal domain was truncated, the pore retained a permanently “open” conformation and could not be inactivated. This supported a “ball-and-chain”-type mechanism for gating of the pore cavity, originally suggested in earlier studies (Hoshi et al., 1990; Zagotta et al., 1990), and which the authors suggest is governed by calcium binding to the soluble domain. The difference in gating mechanism between the Shaker cation channel and the FocA anion channel is that in the former the N-terminal domain is required to inactivate the channel, while in the latter, the N-terminal domain is required to activate the channel. In FocA, there is currently no evidence to suggest that the N-terminal domain might bind a small molecule. We have, however, shown in earlier studies that FocA interacts with the glyceryl-radical enzymes PflB and TdcE (Doberenz et al., 2014; Falke et al., 2016), both of which are formate-producing enzymes. Notably, chemical cross-linking and modeling studies identified numerous interactions between PflB and the N-terminal domain of FocA (Doberenz et al., 2014). It is conceivable, therefore, that PflB and/or TdcE interact with FocA in vivo to facilitate “gating” of the pores of FocA. This would invoke a type of “spring-” or “lever-type” mechanism, whereby the binding of the interacting protein would cause the N-terminal domain to allow the TM2b- Ω -loop to move out of the pore by breaking the hydrogen-bond between His-209 and Thr-91 (*E. coli* FocA numbering), which, based on structural

analyses, has been suggested previously as a possible mechanism controlling opening of the substrate pore (Waight et al., 2013; see also the model in Figure 1b). Such a mechanism would also be in accord with the closed-pore conformation of the FocA structure in which the N-terminal domain was missing (Wang et al., 2009). Although speculative at this stage, this working hypothesis provides a basis for future experiments to address the biochemical mechanism underlying the function of the N-terminal domain.

It is perhaps noteworthy that there were differences in the formate-translocation activity for key amino acid variants, particularly FocAA7-A11 (penta-alanyl tract from positions 7 to 11), depending on whether PflB was in its inactive or active conformation; formate influx was functional but efflux was impaired (see Figures 4 and 6). It has long been proposed that PflB has a significantly different conformation when the glyceryl radical is present in the enzyme compared to when it is not (Knappe & Sawers, 1990) and evidence supporting such a conformational change has been reported (Peng et al., 2010). It seems likely, therefore, that, depending upon whether PflB is in its glyceryl-radical-bearing conformation, a different interaction with FocA occurs compared to when PflB is inactive and this might potentially govern or influence “gating.” It is conceivable, for example, that formate efflux occurs during growth when PflB is active, while influx occurs when growth stops and PflB is in its inactive conformation (Beyer et al., 2013; Suppmann & Sawers, 1994). In the absence of PflB (e.g., strain DH201), it is possible that the glyceryl-radical enzyme TdcE could take over this function (Sawers et al., 1998) and in its active conformation would block formate influx, which is what was observed in the current study when DH201 synthesizes FocAA7-A11 (Figure S6). TdcE, like PflB, has been shown in vitro to interact with FocA (Falke et al., 2016). Of course, the pH shift that occurs upon entry into stationary phase under these growth conditions (see Suppmann & Sawers, 1994) must also be

considered to play a role in protonation of the His-209 residue in the substrate pore of FocA (Lü et al., 2013; Waight et al., 2013).

3.2 | Formate efflux and influx mechanisms are different

FocA was originally suggested to function as a channel for efflux of either formate or undissociated formic acid (Suppmann & Sawers, 1994). Proton-coupled formate efflux would be highly beneficial for an energy-limited fermenting bacterium and recent computational studies support such a proton-anion symport mechanism (Atkovska & Hub, 2017; Lv et al., 2013). This implies, however, that formate uptake is also likely to be via a proton-symport mechanism, suggesting involvement of the proton gradient. Heterologous expression studies of FocA support pH- and proton-driven formate uptake into yeast cells (Wiechert & Beitz, 2017). However, in the homologous *E. coli* system, in cells unable to metabolize formate intracellularly due to a *selC* mutation that prevents selenocysteine incorporation into formate dehydrogenases (Leinfelder et al., 1988), no formate uptake occurs (Beyer et al., 2013). This implies a specific gating mechanism to control formate uptake and not a simple *pmf*-driven proton symport, which would otherwise result in intracellular accumulation of formate. The findings presented in this study indicate that the N-terminal domain of FocA is involved in gating formate influx. Moreover, through the study of sensitivity toward the toxic formate analog hypophosphite, our data also suggest that not only the mechanisms of formate efflux and uptake differ, but also the uptake mechanisms of hypophosphite and formate may exhibit differences. For example, the FocAA7-A11 variant is capable of formate uptake but cells remain resistant to hypophosphite (cf. Figures 6 and S4). The pK_a of formate is 3.75 while that of hypophosphite is 1.1, suggesting that differences in how readily the anion can be protonated has a major impact on influx; nevertheless, the wild-type FocA protein can import both anions. These similarities and differences in anion preference between formate and hypophosphite will be invaluable in future experiments designed to dissect the influx mechanism of the FocA channel.

4 | EXPERIMENTAL PROCEDURES

4.1 | Strains and growth conditions

The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table S2. Preparation of aerobic cultures of *E. coli* for molecular biology experiments was performed in Luria-Bertani (LB) medium (Sambrook et al., 1989). Growth of strains for analysis of β -galactosidase enzyme activity, for determination of formate levels excreted into the growth medium, for hypophosphite-sensitivity analysis, or for preparation of membrane fractions was performed in M9-minimal medium (Sambrook et al., 1989), which included 47.6 mM Na_2HPO_4 , 22 mM KH_2PO_4 , 8.4 mM NaCl, 20 mM NH_4Cl , 2 mM MgSO_4 , 0.1 mM CaCl_2 , 0.1 mM thiamin dichloride, 1 mM trace

element solution (Hormann & Andreesen, 1989), and 0.8% (w/v) glucose as carbon source. Growth of BL21(DE3) strains carrying appropriate Strep-tagged FocA variants for protein purification was done in TB medium, which included 1.2% (w/v) tryptone, 2.4% (w/v) yeast extract, 0.4% (w/v) glycerol, 0.8% (w/v) glucose, 100 mM potassium phosphate, and pH 7 as described (Doberenz et al., 2014; Hunger et al., 2014). Where indicated, sodium formate was added to a final concentration of 20 mM. When required, antibiotics were used at a final concentration of 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for chloramphenicol, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for kanamycin, and 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for ampicillin.

4.2 | Hypophosphite-sensitivity test

The sensitivity of strains transformed with plasmids encoding various FocA variants toward the formate analog hypophosphite was tested by growing strains anaerobically at 37°C in M9 minimal medium containing 0.8% (w/v) glucose and 10 mM sodium hypophosphite. The growth rates of exponential phase cultures were compared after cell growth with and without added hypophosphite. Growth was followed by measuring the optical density at 600 nm of standing liquid cultures (0.2 ml) in microtiter plates using a Tecan Infinite M Nano (Tecan, Germany) spectrophotometer. Experiments were performed in triplicate and growth rates are presented with standard deviation of the mean.

4.3 | Construction of strains and plasmids

In order to construct the strain DH601, a derivative of MC4100 (Casadaban, 1976; MC4100 *focA*, $\Delta act \Omega(act::cat \text{ pACYC184})$, *fdhF_p::lacZ*), the respective $\Delta pflA$ allele was transduced into strain REK701 (*focA*) (Suppmann & Sawers, 1994) using P_{1kc} -mediated transduction with the phage grown on strain 234M1 (MC4100 $\Delta act \Omega(act::cat \text{ pACYC184})$; Wagner et al., 1992), according to the procedure described (Miller, 1972). The correct integration of the chloramphenicol resistance cassette into *pflA* without reintroducing the wild-type *focA* gene was verified by colony PCR using oligonucleotides 5'-CTAAACTGCCGTTTGCTTACG-3' and 5'-GATGTGTTA AAAACGCTGTAGCAGAATGAAGC-3'. Moreover, the presence of the *focA* mutation was verified by PCR using the oligonucleotides 5'-CTGTTTTAGCGGAGGATGCG-3' and 5'-GTTTGC GATACTGAA CGCAAACCG-3'. Finally, MC4100 *focA act::Cm^r* was transduced with $\lambda(fdhF_{p::lacZ})$ (Falke et al., 2010), delivering DH601.

The construction of plasmids carrying *focA* genes encoding N-terminal FocA variants was achieved using expression plasmid *pfocA3* (Falke et al., 2010) as template, either for site-directed mutagenesis (Agilent Technologies) or for PCR of truncated *focA* fragments, which were subcloned into the *pASK-IBA3* (IBA Lifesciences, Göttingen) via *BsaI* restriction sites. Oligonucleotides used for the cloning or mutagenesis methods, and their respective templates if these were not *pfocA3*, are listed in Table S3. The plasmids encoding variants of FocA were transformed into the indicated strains, which

are listed in Table S2, carrying a chromosomal λ *fdhF_p::lacZ* transcriptional fusion (Falke et al., 2010).

4.4 | Preparation of cell extracts and membrane fractions

In order to determine levels of FocA associated with the membrane fraction, cells were grown anaerobically in 1L cultures in M9-glucose medium, exactly as was done when measuring β -galactosidase enzyme activity (see below). To achieve overproduction of selected FocA variants, gene expression of pASK-IBA3 derivatives was induced by addition of 0.2 mg/L anhydrotetracycline (AHT) when the culture attained an OD_{600 nm} of approximately 0.4. Incubation of the culture was continued until an OD_{600 nm} of approximately 1.2–1.6 was reached. Cells were harvested by centrifugation at 4,250g for 20 min and at 4°C and afterward the cell pellet was suspended in 4 ml of 50 mM Tris-HCl, pH 8 including 170 mM NaCl and 2 mM MgSO₄ per g wet cell mass. DNase I (10 mg/ml) and 4 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) were then added and the mixture was incubated for 30 min at 37°C. Cells were disrupted by sonication (25 W for three times 4 min with 0.5 s pulses) on ice. Unbroken cells and cell debris were removed by centrifugation for 45 min at 25,000g and at 4°C. The crude cell extract was used to obtain membrane fractions, which were prepared by ultracentrifugation at 100,000g for 1 hr and at 4°C (Hunger et al., 2014). The supernatant was collected for the determination of PfIB levels in the different strains. The membrane vesicles were suspended in 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 16 mM *n*-Dodecyl- β -D-Maltoside (DDM from Glycon Biochemicals, Luckenwalde, Germany), and the proteins were solubilized at 4°C by overnight incubation. The protein concentration of the solubilized membrane fraction and soluble cytoplasmic fractions was determined (Lowry et al., 1951) using bovine serum albumin as the standard.

4.5 | Overproduction and purification of strep-FocA and variants

For overproduction of FocA variants carrying a C-terminal strep-tag, cultures of *E. coli* BL21(DE3) containing *pfocA3* or the appropriate *pfocA3* variant were grown aerobically at 37°C in 0.4 L of TB medium (Soboh et al., 2012) supplemented with 125 mg/L ampicillin to an OD_{600 nm} of approximately 0.4. Gene expression was induced by addition of 0.2 mg/L AHT and cultures were incubated at 30°C with continuous shaking for a further 18 hr. Cells were harvested by centrifugation as described above and suspended in 20 ml of 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 170 mM NaCl, 2 mM MgSO₄ containing DNase I (10 mg/ml) and 4 mM PMSF. After a brief incubation at 37°C, cells were disrupted by sonication at 4°C and the crude cell extract and membrane fraction were prepared as described above.

To solubilize FocA from the membrane, the membrane pellet was suspended in 5 ml of 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 16 mM DDM, and the mixture was incubated overnight at 4°C. The solution was subsequently centrifuged for 1 hr at 100,000g and at 4°C. The resulting supernatant containing solubilized strep-tagged FocA, or its variants, was supplemented with 3 nM avidin, incubated on ice for 30 min and was then loaded onto a 1 ml column containing 1 ml of Strep-Tactin-Sepharose matrix (IBA Lifesciences, Göttingen). Further purification steps were carried out aerobically and at 4°C, exactly as described in the manufacturer's instructions. The yield of FocA-C-strep and its variants generally was in the range of 0.2–0.6 mg/L of culture. The protein concentration of the strep-tagged FocA variants was determined spectrophotometrically, via absorbance at 280 nm with the calculated extinction coefficients (online ProtParam; Gasteiger et al., 2005).

4.6 | Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and immunoblotting

Aliquots of 1 μ g of the various purified FocA variants were electrophoretically separated in sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE including 12.5% (w/v) polyacrylamide (Laemmli, 1970) and subsequently transferred to nitrocellulose membranes as described (Towbin et al., 1979). Affinity-purified antibodies directed against full-length FocA were prepared by covalently linking purified full-length FocA to AminoLink sepharose (Thermo Fisher) and the bound antibodies were eluted exactly according to the manufacturer's instructions. Antibodies were used at a dilution of 1:1,000 (Falke et al., 2010). The secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Bio-Rad, Munich, Germany) was used according to the manufacturer's instructions. Visualization of the antibody-antigen interaction was achieved using the enhanced chemiluminescence reaction using the enhancer *para*-coumaric acid (Haan & Behrmann, 2007).

Blue-native (BN)-PAGE with 1 μ g of the various purified FocA variants was performed with 4%–16% gradient gels according to (Schagger & von Jagow, 1991) as described (Falke et al., 2010).

For the detection of FocA variants in the solubilized membrane fractions, samples of 100 μ g with respect to protein were separated by gel electrophoresis using either 12.5% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) gels or in 16% Tris-tricine gels (Schagger & von Jagow, 1987). To analyze the corresponding PfIB levels, samples (50 μ g of protein) of the respective soluble cytoplasmic fractions were separated by SDS-PAGE using a 8% (w/v) polyacrylamide gel. After transfer of the proteins to a nitrocellulose membrane, they were treated with antibodies against full-length FocA (membrane fraction) or antibodies raised against PfIB (soluble cytoplasmic proteins). PfIB antiserum was used at a dilution of 1:1,000. The detection of the luminescence was performed as described above. Where indicated, silver-staining of SDS- or BN-PAGE gels was performed using the Pierce Silver-staining kit (Thermo Fisher Scientific), as described by the manufacturer.

4.7 | β -Galactosidase activity assays

The β -galactosidase enzyme activity was determined and calculated according to Miller (1972) and performed as described in (Falke et al., 2010), but with modifications. Different strains were grown anaerobically in 15 ml Hungate tubes in M9-minimal medium containing 0.8% (w/v) glucose. DH4100, DH701, and DH701 transformed with plasmids encoding FocA variants were grown at 37°C until cultures reached the exponential growth phase ($OD_{600\text{ nm}}$ 0.7 to 0.9), usually within 5 to 8 hr. Unless stated otherwise, all FocA variants carried a C-terminal strepII-tag. DH4100, DH601, DH201, and DH601/DH201 containing pfocA3 variants were grown in M9 medium with 20 mM sodium formate at 30°C and reached an $OD_{600\text{ nm}}$ of ~0.8 after 14 to 24 hr. Once the exponential growth phase had been reached, aliquots (100 μ l) of cell suspension were transferred to the wells of a 96-well microtiter plate. Microtiter plates were stored at -20°C until measurements of the kinetics were undertaken. For the β -galactosidase assay thawed cell suspensions were mixed with 20 μ l buffer Z (6.5 mM NaH_2PO_4 , 93.5 mM Na_2HPO_4 , pH 8, 10 mM KCl, and 1 mM MgSO_4) supplemented with 50 mM β -mercaptoethanol and 0.1% (w/v) SDS. Afterward 40 μ l trichloromethane was added, the suspension was mixed thoroughly and incubated at 25°C for 5 min. Afterward, 20 μ l of the substrate 4 mg/ml para-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (PNPG, Sigma Aldrich, purity > 98%) in buffer Z, were added resulting in a final concentration of 0.44 mg/ml PNPG and kinetic measurements were started. The absorbance at 420 nm was measured at 25°C for 1 hr using a Tecan Infinite M Nano (Tecan, Germany) spectrophotometer. The β -galactosidase activity was calculated with the following formula

$$\beta\text{-galactosidase activity} = \frac{1,000 \times m}{v \times OD_{600}}$$

where m = the slope of the linear regression of the kinetic data, and v = volume of cells (0.1 ml).

Each experiment was performed with a complete set of strains and with independent biological replicates, and each assay was determined in triplicate, that is, technical replicates. Data sets were performed multiples times and those presented are representative for each strain. The activities determined for the truncated and amino acid-exchange variants in backgrounds DH701, DH601, and DH201 are presented in relation to the value for the respective strain without a plasmid, which was taken as 100%. Note that the β -galactosidase enzyme activity was similar for the strain without a plasmid and when the same strain carried an insert-free plasmid (data not shown). The absolute β -galactosidase activities, given in Miller units (Miller, 1972) and in relative units, are presented with standard deviation of the mean.

4.8 | Analysis of extracellular formate levels

Strains (DH4100, DH701, and DH701 pfocA3 variants) were grown anaerobically in M9 minimal medium with 0.8% (w/v) glucose.

Samples were prepared by collecting 1.5 ml of each cell suspension once the $OD_{600\text{ nm}}$ of the culture had reached ~0.8 and centrifuging through silicon oil (medium-viscosity, PN200, Roth) at 12,000g for 5 min. The supernatant was separated by anion-exchange chromatography on an Aminex HPX-87H column (300 \times 7.8 mm, polystyrene-divinylbenzene, 9 μ m particle size, and 8% cross linkage) with the Micro-Guard Cation H⁺ Refill Cartridge precolumn (polystyrene-divinylbenzene, both columns from Bio-Rad Laboratories) using the high-performance liquid chromatography (HPLC) apparatus (Prominence UFLC; Shimadzu). Organic acids, such as formate, were eluted with 6 mM H_2SO_4 at a flow rate of 0.3 ml/min. The column was heated to 42°C. The amount of formate in the supernatant was quantified by integration of the area of the respective elution peaks, which were monitored at 210 nm and referenced to a calibration curve in the range of 0.1 to 50 mM formate. Formate concentration was determined in triplicate and the amount of extracellular formate is presented with standard deviation of the mean.

4.9 | Computational analysis of FocA's N-terminal domain

The degree of conservation of the first 36 N-terminal amino acids of a sequence alignment of 258 annotated formate/nitrite channels (FNTs) was assessed and displayed using the WebLogo tool (Figure 1a; online version WebLogo 3; Crooks et al., 2004). For the conservation plot where only FocA channels were compared, the N-terminal domains from 100 formate channels originating from different species were aligned and evaluated with WebLogo 3 (Figure S6).

De novo modeling of 3D conformations of FocA's N-terminus, and variants thereof, was performed by the PEP-FOLD Peptide Structure Prediction Server (online version PEP-FOLD 3.5; Lamiable et al., 2016). The input sequence was the first 36 residues of the native FocA protein or selected FocA variants. Each computational process comprised 200 simulations and the models were sorted based on their sOPEP energy level. The online tool returned the five best structure predictions and the resulting PDB files were loaded into PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, version 0.99, Schrödinger, LLC) and superpositioned to allow structural comparison.

The PyMOL software was also used to illustrate schematically how formate translocation by FocA might be regulated (Figure 1b). X-ray structures of *E. coli* FocA (pdb 3KCU, Wang et al., 2009) and *E. coli* PfIB (pdb 1H18, Becker & Kabsch, 2002) were used to generate figures, and FocA's N-terminal domain was modeled using PEP-FOLD 3.5 (Lamiable et al., 2016).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Marian Baumbach and Mathias Mende for their help in the initial characterization of the truncated variants of FocA. This work was supported in part by the DFG (GRK 1026) and the region of Saxony-Anhalt.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest to report.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Robert Gary Sawers  <https://orcid.org/0000-0003-0862-2683>

REFERENCES

- Atkovska, K. & Hub, J.S. (2017) Energetics and mechanism of anion permeation across formate-nitrite transporters. *Scientific Reports*, *7*, 12027.
- Becker, A. & Kabsch, W. (2002) X-ray structure of pyruvate formate-lyase in complex with pyruvate and CoA. How the enzyme uses the Cys-418 thiol radical for pyruvate cleavage. *Journal of Biological Chemistry*, *277*, 40036–40042.
- Beyer, L., Doberenz, C., Falke, D., Hunger, D., Suppmann, B. & Sawers, R.G. (2013) Coordinating FocA and pyruvate formate-lyase synthesis in *Escherichia coli*: preferential translocation of formate over other mixed-acid fermentation products. *Journal of Bacteriology*, *195*, 1428–1435.
- Casadaban, M.J. (1976) Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *Journal of Molecular Biology*, *104*, 541–555.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J. & Brenner, S.E. (2004) WebLogo: a sequence logo. *Genome Research*, *14*, 1188–1190.
- Czyzewski, B.K. & Wang, D.N. (2012) Identification and characterization of a bacterial hydrosulphide ion channel. *Nature*, *483*, 494–497.
- Doberenz, C., Zorn, M., Falke, D., Nannemann, D., Hunger, D., Beyer, L., et al. (2014) Pyruvate formate-lyase interacts directly with the formate channel FocA to regulate formate translocation. *Journal of Molecular Biology*, *426*, 2827–2839.
- Erler, H., Ren, B., Gupta, N. & Beitz, E. (2018) The intracellular parasite *Toxoplasma gondii* harbors three druggable FNT-type formate and L-lactate transporters in the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, *293*, 17622–17630.
- Falke, D., Doberenz, C., Hunger, D. & Sawers, R.G. (2016) The glycol-radical enzyme 2-ketobutyrate formate-lyase, TdcE, interacts specifically with the formate-translocating FNT-channel protein FocA. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *6*, 185–189.
- Falke, D., Schulz, K., Doberenz, C., Beyer, L., Lillie, H., Thieme, B., et al. (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 Microbiology Letters*, *303*, 69–75.
- Fan, C., Sukomon, N., Flood, E., Rheinberger, J., Allen, T.W. & Nimigeon, C.M. (2020) Ball-and-chain inactivation in a calcium-gated potassium channel. *Nature*, *580*, 288–293.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., et al. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker, J.M. (Ed.) *The proteomics protocols handbook*, Humana Press. pp. 571–607.
- Golldack, A., Henke, B., Bergmann, B., Wiechert, M., Erler, H., Blancke Soares, A., et al. (2017) Substrate-analogous inhibitors exert antimalarial action by targeting the *Plasmodium* lactate transporter PfFNT at nanomolar scale. *PLoS Pathogens*, *13*, e1006172.
- Haan, C. & Behrmann, I. (2007) A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. *Journal of Immunological Methods*, *318*, 11–19.
- Hapuarachchi, S.V., Cobbold, S.A., Shafik, S.H., Dennis, A.S., McConville, M.J., Martin, R.E., et al. (2017) The malaria parasite's lactate transporter PffNT is the target of antiplasmodial compounds identified in whole cell phenotypic screens. *PLoS Pathogens*, *13*, e1006180.
- Hormann, K. & Andreesen, J.R. (1989) Reductive cleavage of sarcosine and betaine by *Eubacterium acidaminophilum* via enzyme systems different from glycine reductase. *Archives of Microbiology*, *153*, 50–59.
- Hoshi, T., Zagotta, W.N. & Aldrich, R.W. (1990) Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science*, *250*, 533–538.
- Hunger, D., Doberenz, C. & Sawers, R.G. (2014) Identification of key residues in the formate channel FocA that control import and export of formate. *Biological Chemistry*, *395*, 813–825.
- Hunger, D., Röcker, M., Falke, D., Lillie, H. & Sawers, R.G. (2017) The C-terminal six amino acids of the FNT channel FocA are required for formate translocation but not homopentamer integrity. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1616.
- Knappe, J. & Sawers, R.G. (1990) A radical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews*, *75*, 383–398.
- Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680–685.
- Lamiable, A., Thévenet, P., Rey, J., Vavrusa, M., Derreumaux, P. & Tufféry, P. (2016) PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex. *Nucleic Acids Research*, *44*, 449–454.
- Leinfelder, W., Zehelein, E., Mandrand-Berthelot, M.A. & Böck, A. (1988) Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine. *Nature*, *331*, 723–725.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. & Randall, R. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, *193*, 265–275.
- Lü, W., Du, J., Schwarzer, N.J., Gerbig-Smentek, E., Einsle, O. & Andrade, S.L. (2012a) The formate channel FocA exports the products of mixed-acid fermentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *109*, 13254–13259.
- Lü, W., Du, J., Schwarzer, N.J., Wacker, T., Andrade, S.L. & Einsle, O. (2013) The formate/nitrite transporter family of anion channels. *Biological Chemistry*, *394*, 715–727.
- Lü, W., Du, J., Wacker, T., Gerbig-Smentek, E., Andrade, S.L. & Einsle, O. (2011) pH-dependent gating in a FocA formate channel. *Science*, *332*, 352–354.
- Lü, W., Schwarzer, N.J., Du, J., Gerbig-Smentek, E., Andrade, S.L. & Einsle, O. (2012b) Structural and functional characterization of the nitrite channel NirC from *Salmonella* Typhimurium. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *109*, 18395–18400.
- Lv, X., Liu, H., Ke, M. & Gong, H. (2013) Exploring the pH-dependent substrate transport mechanism of FocA using molecular dynamics simulation. *Biophysical Journal*, *105*, 2714–2723.
- Miller, J. (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Mukherjee, M., Vajpal, M. & Sankararamkrishnan, R. (2017) Anion-selective formate/nitrite transporters: taxonomic distribution, phylogenetic analysis and subfamily-specific conservation pattern in prokaryotes. *BMC Genomics*, *18*, 560.
- Peakman, T., Crouzet, J., Mayaux, J.F., Busby, S., Mohan, S., Harbourne, N., et al. (1990) Nucleotide sequence, organisation and structural analysis of the products of genes in the *nirB-cysG* region of the *Escherichia coli* chromosome. *European Journal of Biochemistry*, *191*, 315–323.
- Peng, Y., Veneziano, S.E., Gillispie, G.D. & Broderick, J.B. (2010) Pyruvate formate-lyase, evidence for an open conformation favored in the presence of its activating enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, *285*, 27224–27231.

- Plaga, W., Frank, R. & Knappe, J. (1988) Catalytic-site mapping of pyruvate formate lyase: hypophosphite reaction on the acetyl-enzyme intermediate affords carbon-phosphorus bond synthesis (1-hydroxyethylphosphonate). *European Journal of Biochemistry*, **178**, 445–450.
- Rossmann, R., Sawers, G. & Böck, A. (1991) Mechanism of regulation of the formate-hydrogenlyase pathway by oxygen, nitrate and pH: definition of the formate regulon. *Molecular Microbiology*, **5**, 2807–2814.
- Saier, M.H. Jr., Eng, B.H., Fard, S., Garg, J., Haggerty, D.A., Hutchinson, W.J., et al. (1999) Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, **1422**, 1–56.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sawers, G. & Böck, A. (1988) Anaerobic regulation of pyruvate formate-lyase from *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, **170**, 5330–5336.
- Sawers, G. & Böck, A. (1989) Novel transcriptional control of the pyruvate formate-lyase gene: upstream regulatory sequences and multiple promoters regulate anaerobic expression. *Journal of Bacteriology*, **171**, 2485–2498.
- Sawers, G., Heßlinger, C., Müller, N. & Kaiser, M. (1998) The glycol radical enzyme TdcE can replace pyruvate formate-lyase in glucose fermentation. *Journal of Bacteriology*, **180**, 3509–3516.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, **166**, 368–379.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry*, **199**, 223–231.
- Soboh, B., Stripp, S.T., Muhr, E., Granich, C., Brausemann, M., Herzberg, M., et al. (2012) [NiFe]-hydrogenase maturation: isolation of a HypC–HypD complex carrying diatomic CO and CN- ligands. *FEBS Letters*, **586**, 3882–3887.
- Suppmann, B. (1993) *Genetische Untersuchungen zum Formiat-Transport in Escherichia coli*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Suppmann, B. & Sawers, G. (1994) Isolation and characterisation of hypophosphite-resistant mutants of *Escherichia coli*: identification of the FocA protein, encoded by the *pfl* operon, as a putative formate transporter. *Molecular Microbiology*, **11**, 965–982.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **76**, 4350–4354.
- Wagner, A.F., Frey, M., Neugebauer, F.A., Schäfer, W. & Knappe, J. (1992). The free radical in pyruvate formate-lyase is located on glycine-734. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **89**(3), 996–1000.
- Waight, A.B., Czystewski, B.K. & Wang, D.N. (2013) Ion selectivity and gating mechanisms of FNT channels. *Current Opinion in Structural Biology*, **23**, 499–506.
- Waight, A.B., Love, J. & Wang, D.N. (2010) Structure and mechanism of a pentameric formate channel. *Nature Structural and Molecular Biology*, **17**, 31–37.
- Wang, Y., Huang, Y., Wang, J., Cheng, C., Huang, W., Lu, P., et al. (2009) Structure of the formate transporter FocA reveals a pentameric aquaporin-like channel. *Nature*, **462**, 467–472.
- White, W.B. & Ferry, J.G. (1992) Identification of formate dehydrogenase-specific messenger-RNA species and nucleotide-sequence of the *fdhC* gene of *Methanobacterium formicicum*. *Journal of Bacteriology*, **174**, 4997–5004.
- Wiechert, M. & Beitz, E. (2017) Mechanism of formate-nitrite transporters by dielectric shift of substrate acidity. *EMBO Journal*, **36**, 949–958.
- Zagotta, W.N., Hoshi, T. & Aldrich, R.W. (1990) Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science*, **250**, 568–571.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Kammel M, Hunger D, Sawers RG. The soluble cytoplasmic N-terminal domain of the FocA channel gates bidirectional formate translocation. *Mol Microbiol.* 2021;115:758–773. <https://doi.org/10.1111/mmi.14641>

Kapitel 2 – Einfluss des zentralen H209 auf die Formiat-Translokationsaktivität

- II) A single amino acid exchange converts FocA into a unidirectional efflux channel for formate – *Microbiology* 2022

Zusammenfassung Publikation II

In dieser Veröffentlichung wurde die Substitution einer der am stärksten konservierten Aminosäuren der Formiat-Nitrit-Transporter – des in der Translokationspore zentral lokalisierten und mechanistisch relevanten Histidins (in *E. coli* FocA H209) – auf das Translokationsverhalten am Beispiel des *E. coli* Formiat-Kanals FocA analysiert. Es gibt wenige natürlich vorkommende Varianten für den Austausch von Histidin und diese schließen die Substitutionen durch Asparagin (*B. thuringiensis*) bzw. Glutamin (*E. histolytica*) ein.

Nachdem gezeigt wurde, dass der Aminosäureaustausch von H209 in eine nicht protonierbare Aminosäure weder die Synthese noch die Membranintegrität von FocA beeinflussten, wurde die Formiat/Ameisensäure-Translokation durch verschiedene *in vivo* Experimente untersucht. Es zeigte sich, dass FocA_{H209N} eine deutlich stärkere Effluxaktivität im Vergleich zu nativem FocA auswies. Diese Ergebnisse der β -Galaktosidase-Analyse wurden durch HPLC-Untersuchungen, die stark erhöhte Formiat-Konzentrationen im Kulturüberstand detektierten, bestätigt. Eine zeitaufgelöste Studie implizierte außerdem, dass in der mit *pfocA*-H209N komplementierten *focA*-Mutante (DH701) zu keinem Zeitpunkt eine intrazelluläre Akkumulation des Formiats beobachtet werden konnte und dieses auch nicht wie im Parentalstamm in die Zellen importiert wurde. Neben dem defizitären Formiat-Influx konnte für FocA_{H209N} keine Sensitivität gegenüber dem Formiat-Analogen Hypophosphit festgestellt werden, was bedeutet, dass dieses auch nicht in die Zelle aufgenommen wurde. Die fehlende Aktivität des Formiat-Hydrogenlyase Komplexes in Zellen, die ausschließlich FocA_{H209N} synthetisierten, bestätigte, dass die intrazelluläre Formiat-Konzentration durchgängig sehr gering war.

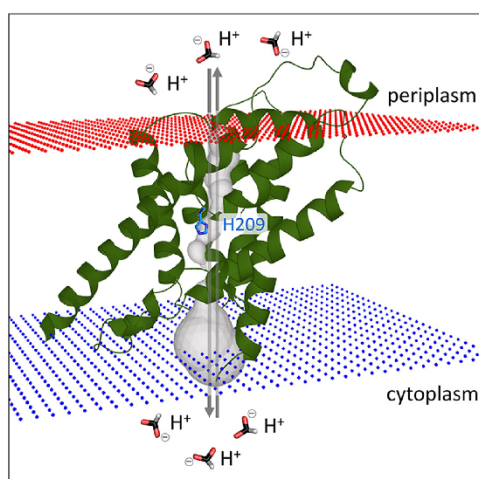
Unterschiede im Formiat-Efflux der FocA_{H209N}-Variante in Abhängigkeit des aktiven bzw. inaktiven Zustands des Formiat-produzierenden Enzyms PflB konnten nicht beobachtet werden. Wie schon aus Kapitel 1 hervorgeht, ist der Formiat-Efflux abhängig vom N-Terminus des Proteins, so auch für eine verkürzte FocA_{H209N}-Variante.

Darüber hinaus zeigten Studien, dass wenn Zellen sowohl natives als auch FocA_{H209N} synthetisierten, dass das Wildtyp-Protein dominant gegenüber der Variante war.

Insgesamt konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass FocA_{H209N} ein unidirektional funktionierender Kanal ist, da Substitutionen des Histidins die Bidirektionalität der Formiat/Ameisensäure-Translokation inhibierten. Die Ergebnisse stützen die These, dass der Mechanismus des Formiat-Exports bzw. -Imports unterschiedlich ist. Daher wurde die mechanistische Bedeutung des Histidins insbesondere in Bezug auf den Formiat-Influx, bei welchem es die Protonierung des zu translozierenden Ions übernimmt, postuliert.

A single amino acid exchange converts FocA into a unidirectional efflux channel for formate

Michelle Kammel, Oliver Trebbin†, Constanze Pinske and R. Gary Sawers*



Graphical abstract

The pentameric FocA channel translocates formate (formic acid) bidirectionally across the cytoplasmic membrane. The histidine in the pore of each FocA protomer is required.

Abstract

During mixed-acid fermentation, *Escherichia coli* initially translocates formate out of the cell, but re-imports it at lower pH. This is performed by FocA, the archetype of the formate-nitrite transporter (FNT) family of pentameric anion channels. Each protomer of FocA has a hydrophobic pore through which formate/formic acid is bidirectionally translocated. It is not understood how the direction of formate/formic acid passage through FocA is controlled by pH. A conserved histidine residue (H209) is located within the translocation pore, suggesting that protonation/deprotonation might be linked to the direction of formate translocation. Using a formate-responsive *lacZ*-based reporter system we monitored changes in formate levels *in vivo* when H209 in FocA was exchanged for either of the non-protonatable amino acids asparagine or glutamine, which occur naturally in some FNTs. These FocA variants (with N or Q) functioned as highly efficient formate efflux channels and the bacteria could neither accumulate formate nor produce hydrogen gas. Therefore, the data in this study suggest that this central histidine residue within the FocA pore is required for pH-dependent formate uptake into *E. coli* cells. We also address why H209 is evolutionarily conserved and provide a physiological rationale for the natural occurrence of N/Q variants of FNT channels.

Received 23 November 2021; Accepted 30 November 2021; Published 27 January 2022

Author affiliations: †Institute for Biology/Microbiology, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Kurt-Mothes-Str. 3, 06120 Halle (Saale), Germany.

*Correspondence: R. Gary Sawers, gary.sawers@mikrobiologie.uni-halle.de

Keywords: anion channel; conserved histidine; FNT family; formate uptake; hydrophobic pore.

Abbreviations: AHT, anhydrotetracycline; FHL, formate hydrogenlyase; FNT, formate-nitrite transporter; FocA, formate channel A; HSC, hydrosulfide channel; NirC, nitrite channel; PfFNT, plasmodium falciparum lactate channel; PflB, pyruvate formate-lyase.

†Present address: IMD Laboratory Oderland GmbH, Am Kleistpark 1, Frankfurt (Oder), Germany.

Two supplementary tables and four supplementary figures are available with the online version of this article.

001132 © 2022 The Authors



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

INTRODUCTION

Formate is a by-product of enterobacterial mixed-acid fermentation and is an energy source for many microorganisms [1–3]. The physiology of formate metabolism is probably best understood for *Escherichia coli*. In *E. coli*, formate is produced from pyruvate by PflB (pyruvate formate-lyase) [4]. Especially under low-pH conditions, formate is further disproportionated to H₂ and CO₂ by the cytoplasmically oriented, membrane-associated formate hydrogenlyase (FHL) complex [2, 5]. During fermentation with glucose, and at pH ≥ 6.5 , formate is translocated to the periplasm. However, at a medium pH ≤ 6.0 – 6.5 , formate/formic acid is re-imported and metabolized by the FHL complex [6]. Bi-directional translocation of formate across the cytoplasmic membrane is carried out by the formate channel, FocA [6]. How FocA controls the direction of passage of formate across the membrane in response to pH is unresolved. Moreover, it is also unknown whether formate, or undissociated formic acid, is translocated through FocA. Uptake of the formate anion into the negatively charged cytoplasm would be thermodynamically challenging, if it acts as a channel for the anion, compared to flow of the undissociated acid down a concentration gradient.

FocA belongs to the family of evolutionarily ancient, pentameric FNT (formate-nitrite transporter) anion channels, which are widespread in bacteria, but are also found in some archaea and protists [7–10]. Each protomer of the pentamer possesses a pore through which small monovalent anions are specifically translocated. Since the discovery of FocA [6], several other FNTs have been identified, which translocate other monovalent anions, such as nitrite (NirC), hydrosulfide (HSC) and lactate (PjFNT) [11–16].

The translocation pore can be viewed as two funnel-like vestibules connected by a hydrophobic central core (see Fig. 1a). The vestibules are accessible to the cytoplasm and periplasm and abut the hydrophobic core via two narrow constriction sites, which act to restrict anion access [8–10]. Surprisingly, the hydrophobic core of all FNT channels has a similar set of conserved amino acid residues lining the pore [17, 18]. This suggests that FNT channels share a common mechanism for anion translocation and that anion selectivity occurs at the vestibules [17–19]. Evidence supporting this proposal was provided by showing that the soluble cytoplasmic N-terminal domain, which engages with the cytoplasmic vestibule, is important in gating formate translocation by *E. coli* FocA [20]. Nevertheless, as the N-terminal domain controls formate translocation in both the outward and the inward directions, this suggests that a further mechanism determines the pH-dependent direction of formate passage through FocA.

Of the conserved residues within the hydrophobic core of the pore, the only residue that can acquire a charge is a centrally located histidine (H209 in *E. coli* FocA; see Fig. 1a). The histidine is part of an interaction network with a threonine and a bound water [11], which has been suggested to allow H⁺ recycling, and to aid directional control of anion passage through the hydrophobic core of the channel [17, 18]. Notably, H209 is conserved in ~99% of FNT family members [19], with the exceptions having either asparagine or glutamine at this position (Fig. 1b). The pK_a of the imidazole side chain of histidine is approximately 6.0, suggesting that this residue might be involved in governing pH-dependent formate passage through the pore. An earlier mutagenesis study showed that exchange of H209 for a tyrosine residue resulted in apparent increased intracellular formate levels, suggesting impaired anion efflux [21]. Electrophysiological studies also implicated H209 as being required for anion translocation [10, 11], whereas a study in which the histidine was replaced by one of the naturally occurring non-protonatable amide amino acids (Gln or Asn) concluded that the histidine has a mainly structural role [19, 22]. To resolve whether the histidine residue has a structural role or a function in anion translocation, we tested these models under physiological conditions and in the homologous host, *E. coli*. We make use of a chromosomally encoded, formate-responsive *fdhF_p::lacZ* fusion, which enables facile monitoring of changes in intracellular formate concentration [20, 21, 23]. Our findings reveal that exchange of H209 for either asparagine or glutamine converts FocA into an exclusive formate-efflux channel and demonstrate the significance of the cellular context for regulation of formate translocation.

METHODS

Bacterial strains, plasmids and growth conditions

The strains and plasmids used in this study are listed in Table S1 (available in the online version of this article). The growth conditions used in this study were exactly as described previously [20]. Growth of strains for analysis of β -galactosidase enzyme activity, for hypophosphite-sensitivity analysis, for quantitative assessment of growth, for determination of formate, lactate and glucose levels in the culture medium, and for preparation of membrane fractions for subsequent western blot analysis was done anaerobically in M9-minimal medium [24], at 37 °C, and with 0.8% (w/v) glucose as carbon source. To determine the growth rate under aerobic conditions, the cells were cultivated in 250 ml baffled flasks containing 50 ml M9-minimal medium with 0.4% (w/v) glucose under vigorous shaking (250 r.p.m.) at 37 °C. To analyse growth of strains in rich medium, TGYEP medium [25],

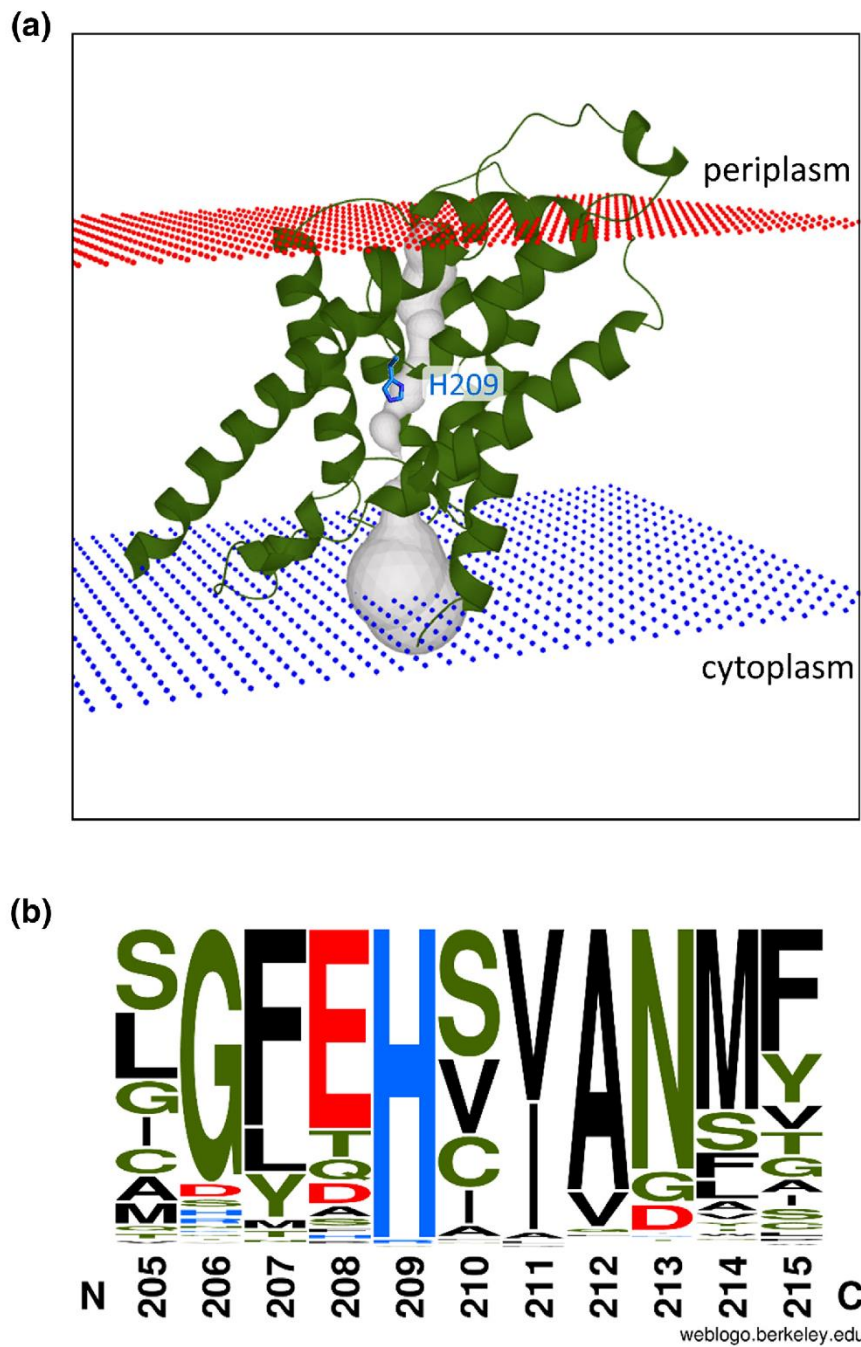


Fig. 1. Conservation of histidine residue 209 within the pore of FNT channels. (a) Illustration of the central position of histidine 209 (stick representation, blue) within FocA's translocation pore. The protomer (PDB 3KCU [8]) is displayed in green and ribbon representation and the pore (grey) was modelled using the MOLE 2.5 online tool (for parameters, see Methods). (b) Conservation plot comparing the amino acid residues between positions 205 and 215 using 306 FNT channels to create a WebLogo 3 stacking plot (see Methods). The residues are aligned with native FocA from *E. coli*, whose sequence (residues 205–215) is presented below the plot. Amino acid residues displayed in black possess an apolar side chain (A, F, I, L, M, P, V, W) and polar side chains are indicated in green (C, G, N, Q, S, T, Y). Acidic amino acids are shown in red (D, E) and basic amino acid residues are shown in blue (H, K, R).

including 1% (w/v) tryptone, 0.5% (w/v) yeast extract and 100 mM potassium phosphate pH 7 and 0.8% (w/v) glucose, was used. Sodium formate was added to a final concentration of 20 mM, where indicated, and antibiotics were used at a final concentration of 100 µg ml⁻¹ for kanamycin and 100 µg ml⁻¹ for ampicillin, when required.

Constructions of strains and plasmids

Plasmid pfocA carries the native *E. coli* *focA* gene and was constructed using pfocA3 [26]. Therefore, pfocA3, a pASK-IBA3 plasmid coding for *focA* with a C-terminal StrepII-tag, was used as template and a stop-codon was re-introduced at the 3' end of the gene, truncating the StrepII-fusion peptide. The oligonucleotide primers (IDT BVBA) used for this site-directed mutagenesis experiment were *focA_stop_fw* and *focA_stop_rev* and are listed in Table S2. All mutated *focA* genes encoding the amino acid exchange variants of FocA used in this study were constructed with pfocA as DNA template and the oligonucleotide primers listed in Table S2, with site-directed mutagenesis experiments carried out according to the Agilent QuikChange protocol (Agilent Technologies). To introduce a chromosomal substitution of codon 209 in the *focA* gene, a 2220 bp fragment, ranging from ~460 bp upstream of *focA* to codon 280 within *pflB*, was amplified by PCR with oligonucleotides *focA_pMAK_fw* and *focA_pMAK_rev* (Table S2) using MC4100 genomic DNA as template. This PCR fragment, which included 5' *Hind*III and 3' *Sac*I restriction sites, was first subcloned into pJET1.2 (Thermo Fischer). Site-directed mutagenesis to replace histidine 209 with asparagine was performed as described above (oligonucleotides in Table S2). The *focA-pflB* DNA fragment, including the codon 209 substitution, was excised from pJET1.2 by digestion with *Hind*III and *Sac*I and cloned into the similarly digested pMAK705 [27]. The mutated *focA* allele was then recombined into the chromosome of strain MC4100, following the protocol of Hamilton et al. [27], and resulted in strain MC4200.

To introduce the formate-responsive *lacZ*-based reporter, MC4200 and REK702 were transfected with phage λ(*fdhF_p::lacZ*) [23], yielding strains DH4200 and DH702, respectively. All introduced site-specific mutations were verified by DNA sequence analysis of the complete *focA* gene.

Preparation of membrane fractions and protein purification

Preparation of membrane fractions for the identification of FocA variants was performed exactly as previously described [20].

PAGE and immunoblotting

Western blot analysis of membrane fractions bearing FocA, in which polypeptides were separated by gel electrophoresis using either 12.5% (w/v) SDS gels [28] or 16% Tris-tricine gels [29], was carried out using anti-FocA antiserum (typically diluted 1:1000) as described [20, 30].

Hypophosphite-sensitivity test

The sensitivity of strains transformed with plasmids encoding various FocA variants toward the formate analogue hypophosphite was tested by determining anaerobic growth rates of strains at 37 °C in M9 minimal medium containing 0.8% (w/v) glucose and 0.5 mM sodium hypophosphite, as previously described [20]. Experiments were performed in triplicate and growth rates are presented with standard deviation of the mean.

β-Galactosidase enzyme activity assay

The β-galactosidase enzyme activity was determined and calculated according to Miller [31], but performed with the modifications described [20].

Analysis of formate, lactate and glucose concentrations in the culture medium

The analysis of extracellular formate and glucose levels by HPLC was performed exactly as described [20]. The concentration of organic acids in the culture supernatant was monitored at 210 nm and glucose concentration was determined using the refractive index detector.

Analysis of formate translocation and metabolic changes through the growth phase

To analyse formate translocation over time with regard to growth and pH of the culture medium, strains were grown in serum bottles (100 ml cultures in M9-minimal medium with glucose as carbon source), and samples were taken every hour and used for β-galactosidase enzyme activity analysis. The respective supernatants were then used to determine organic acid and glucose levels by HPLC and to determine pH. The experiments were performed with minimally three biological replicates and the determined parameters are presented with standard deviation of the mean. To analyse the effect of elevated FocA levels on translocation activity, *focA* expression was induced by addition of AHT (anhydrotetracycline) at 0.2 µg ml⁻¹, when cells entered the exponential growth phase (OD₆₀₀ ~0.4).

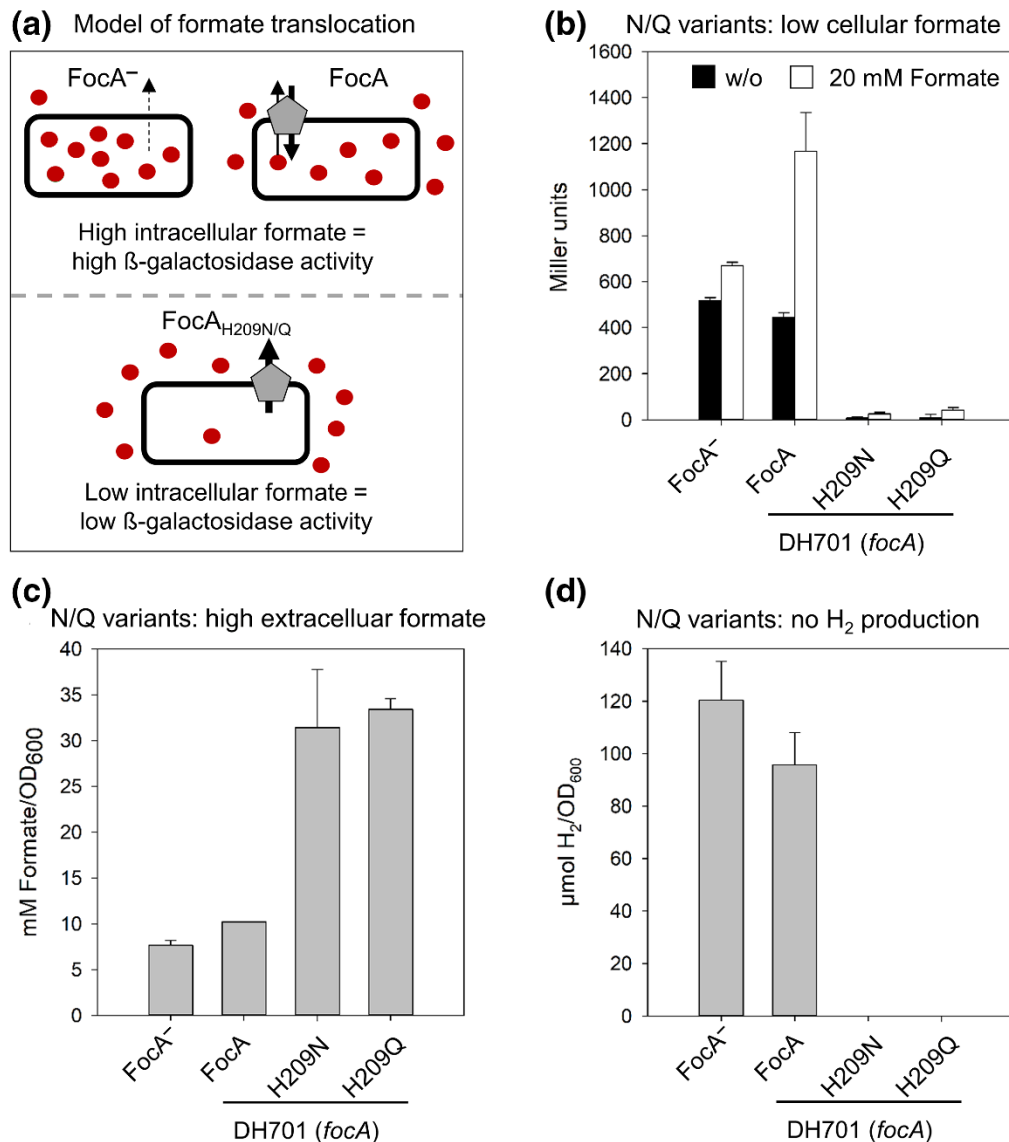


Fig. 2. Histidine-209 is essential for bi-directional translocation of formate by FocA. Parameters determined to monitor changes in formate translocation were investigated in the *focA* mutant DH701 (*focA*) and in DH701 complemented with plasmids carrying a *focA* gene encoding the indicated H209 variants. Strains were grown anaerobically in glucose-M9-minimal medium. (a) Schematic representation of the output of the *fdhF₊::lacZ* reporter system used to monitor changes in intracellular formate (red circles) levels. (b) β -Galactosidase enzyme activity of the respective strains was analysed in cells grown in culture medium without (black histogram) and with exogenously added 20 mM formate (white histogram). (c) The concentration of formate in the culture medium was determined by HPLC analysis. (d) H₂ evolved by cells accumulated in the headspace of the cultures during growth in glucose-M9-minimal medium. H₂ was determined quantitatively using GC. All experiments were performed with minimally three biological replicates, with each assay performed in duplicate.

Analysis of H₂ production via GC

An additional analysis to yield indirect information on intracellular formate levels is the investigation of FHL complex activity by quantification of the amount of H₂ production by cultures. DH701 strains complemented with plasmids carrying genes encoding different FocA variants were grown anaerobically in 15 ml Hungate tubes in M9-minimal medium containing glucose with 10 ml head space at 37°C until cultures reached the end of the exponential growth phase (OD₆₀₀ of 0.6–0.9). GC measurements

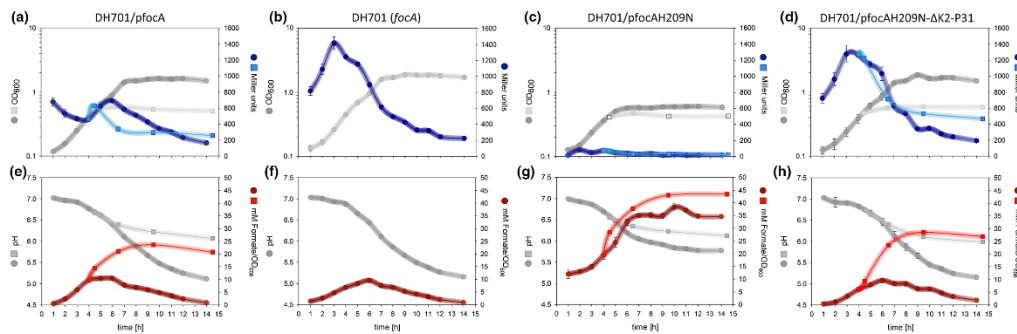


Fig. 3. Cells synthesizing the FocA_{H209N} variant function as unidirectional formate efflux channels. Strains DH701 (*focA*), DH701/pfocA, DH701/pfocAH209N and DH701/pfocAH209N-ΔK2-P31 were grown anaerobically in glucose-M9-minimal medium in crimp-sealed serum bottles. Samples were taken every hour to analyse optical density (OD₆₀₀), determine β-galactosidase enzyme activity, pH and formate levels of the culture medium. (a, h) Results obtained for strain DH701. (b, f) for strain DH701/pfocA. (c, g) for strain DH701/pfocAH209N and (d, h) for strain DH701/pfocAH209N-ΔK2-P31. Parameters obtained for strains, whose *focA* gene expression was elevated by addition of 0.2 mg l⁻¹ AHT (anhydrotetracycline) after entering the exponential growth phase, are presented as filled squares. Data for strains grown without AHT treatment are displayed as circles. The colour-coding is as follows: light grey, OD₆₀₀; blue, β-galactosidase activity; dark grey, pH; and red, external formate concentration, which was calculated with respect to OD₆₀₀. All experiments were performed with three biological replicates.

were carried out as described previously [32]. The experiments were performed with three biological replicates, with each assay performed in duplicate, and the amount of H₂ was calculated with reference to the optical density (OD₆₀₀) and is presented with standard deviation of the mean.

Computational tools

To illustrate the central position of His209 within the FocA pore, the MOLE 2.5 online tool [33] was used. A FocA monomer (chain A) of PDB structure 3KCU [8] was used to model the pore using 5 Å as the probe radius and 0.8 Å as the interior threshold. Moreover, the membrane region was visualized.

The degree of conservation of amino acids 205–215 (*E. coli* FocA numbering) of a sequence alignment of 306 annotated FNTs was assessed and displayed using the WebLogo tool (Fig. 1b; online version WebLogo 3) [34].

RESULTS

Changing H209 to either Asn or Gln converts FocA to a formate efflux channel

To determine the importance of H209 for formate translocation (note that unless specifically discussed, we do not distinguish at this juncture between formate or formic acid), we utilized an established *in vivo* formate-responsive reporter system [23], which functions as depicted schematically in Fig. 2(a). This system makes use of a chromosomally localized, formate-sensitive, *lacZ*-based reporter (*fdhF_p::lacZ*), in which the promoter of the formate dehydrogenase (*fdhF*) gene is used. Strains unable to generate formate intracellularly do not express the *fdhF_p::lacZ* gene fusion, and consequently have essentially no β-galactosidase enzyme activity [20, 23]. In contrast, an *E. coli* *focA* mutant (strain DH701; see Table S1) that generates and retains an increased concentration of formate within its cytoplasm after fermentative growth on glucose has a β-galactosidase enzyme activity of 517±13 Miller units (Fig. 2b). As established before [20], introduction of the *focA* gene encoding native, unmodified FocA on plasmid pfocA into strain DH701 resulted in a β-galactosidase enzyme activity that was roughly 85% of the level measured in DH701 without FocA (Fig. 2b). This control confirms that FocA is able to translocate formate out of the cytoplasm (Fig. 2b). This reporter system thus allows FocA channel activity to be monitored in its physiological context, enabling us to define the role of the H209 residue within the translocation pore. Therefore, we exchanged H209 with either an asparagine (FocA_{H209N}) or a glutamine (FocA_{H209Q}) residue at this position. These are the only residues known to be substituted naturally for His within FNT channels [19], and, although polar, neither amino acid side-chain can be protonated. Plasmids carrying *focA* genes encoding FocA_{H209N} or FocA_{H209Q} were introduced into strain DH701. Western blotting experiments using anti-FocA peptide antibodies confirmed that these FocA variants were synthesized and correctly located in the membrane fraction of the respective strains (Fig. S1a, b). Fermentative growth, which results in the conversion of up to one-third of the carbon from glucose into formate, failed to show measurable β-galactosidase enzyme activity in strains synthesizing these variants (<10 Miller units, Fig. 2b). These results indicate that intracellular formate levels in these strains remained below the threshold (approximately 5 mM) required

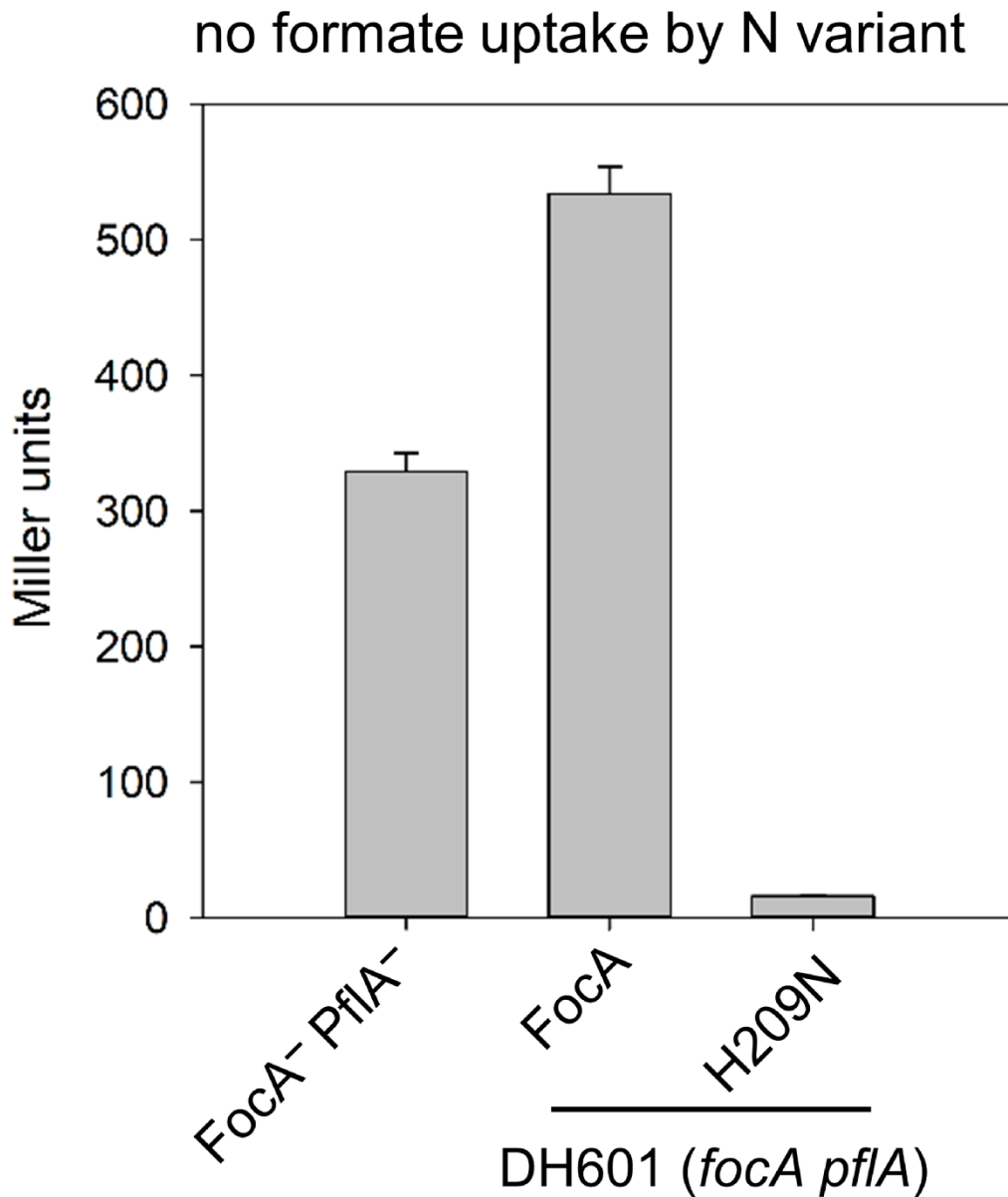


Fig. 4. The FocA_{H209N} variant is not able to take up formate. Formate translocation was investigated in the *focA* and *pflA* mutant DH601 (*focA pflA*) and in DH601 complemented with plasmids carrying a gene encoding either native FocA or FocA_{H209N}. β -Galactosidase enzyme activity of the respective strains was analysed in cells grown anaerobically in glucose-M9-minimal medium with exogenously added 20mM formate. The experiment was carried out with minimally three biological replicates, with each assay performed in duplicate.

to induce expression of the *fdhF_p::lacZ* reporter [23, 35]. These FocA_{H209N} and FocA_{H209Q} variants are thus suggested to remove formate with high efficiency from the cell's cytoplasm.

To address this suggestion, we determined the extracellular formate concentration in the culture medium for strain DH701 synthesizing either FocA_{H209N} or FocA_{H209Q} (Fig. 2c). When strain DH701 synthesizes either of these two variants, extracellular formate accumulated to a concentration of approximately 30 mM OD₆₀₀⁻¹, which is a concentration roughly three times higher than in cultures containing cells synthesizing the native FocA channel (10.2 mM OD₆₀₀⁻¹, Fig. 2c). This experiment confirmed

Low hypophosphite uptake by N variant

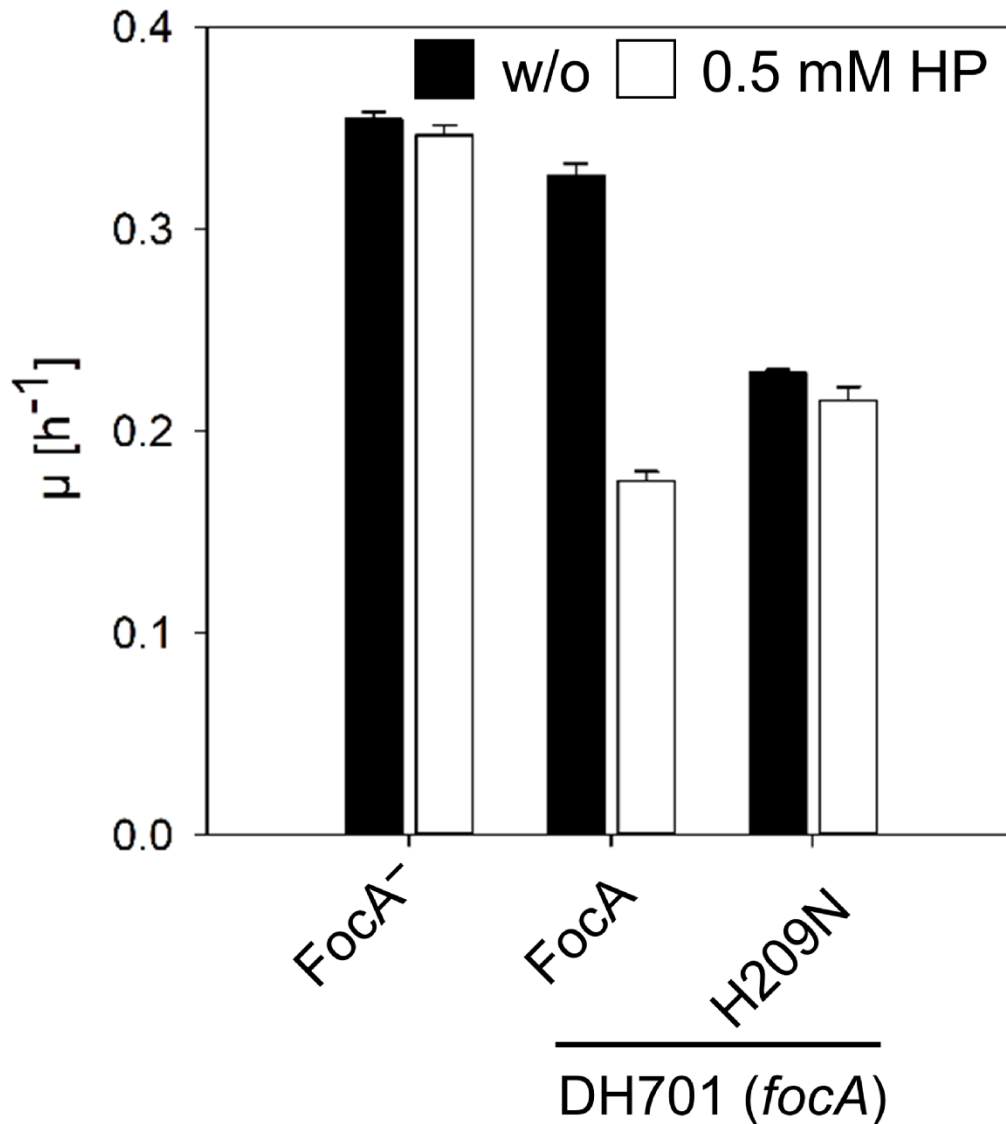


Fig. 5. Histidine-209 is essential for uptake of hypophosphite by FocA. Sensitivity of strain DH701 (*focA*) synthesizing different FocA amino acid exchange variants toward hypophosphite was assessed by determining anaerobic growth rates in glucose-minimal medium in the absence (black histograms) or presence of 0.5 mM sodium hypophosphite (white histograms). The experiments were performed in triplicate.

that strain DH701 synthesizing FocA_{H209N} or FocA_{H209Q} translocated more formate into the extracellular medium compared to the native FocA protein with a histidine residue at amino acid position 209.

Next, we tested whether adding 20 mM formate to the medium from the start of growth could overcome the lack of expression of the *fdhF_p::lacZ* fusion in strains synthesizing FocA_{H209N} or FocA_{H209Q}. Exogenously added formate (20 mM) failed to cause any apparent increase in the β -galactosidase enzyme activity of strain DH701 synthesizing either FocA_{H209N} or FocA_{H209Q} (<50 Miller units, Fig. 2b), while addition of 20 mM formate to a culture of strain DH701 synthesizing native FocA caused an approximate 2.5-fold increase in β -galactosidase enzyme activity (>1100 Miller units, Fig. 2b) compared to when no additional formate was

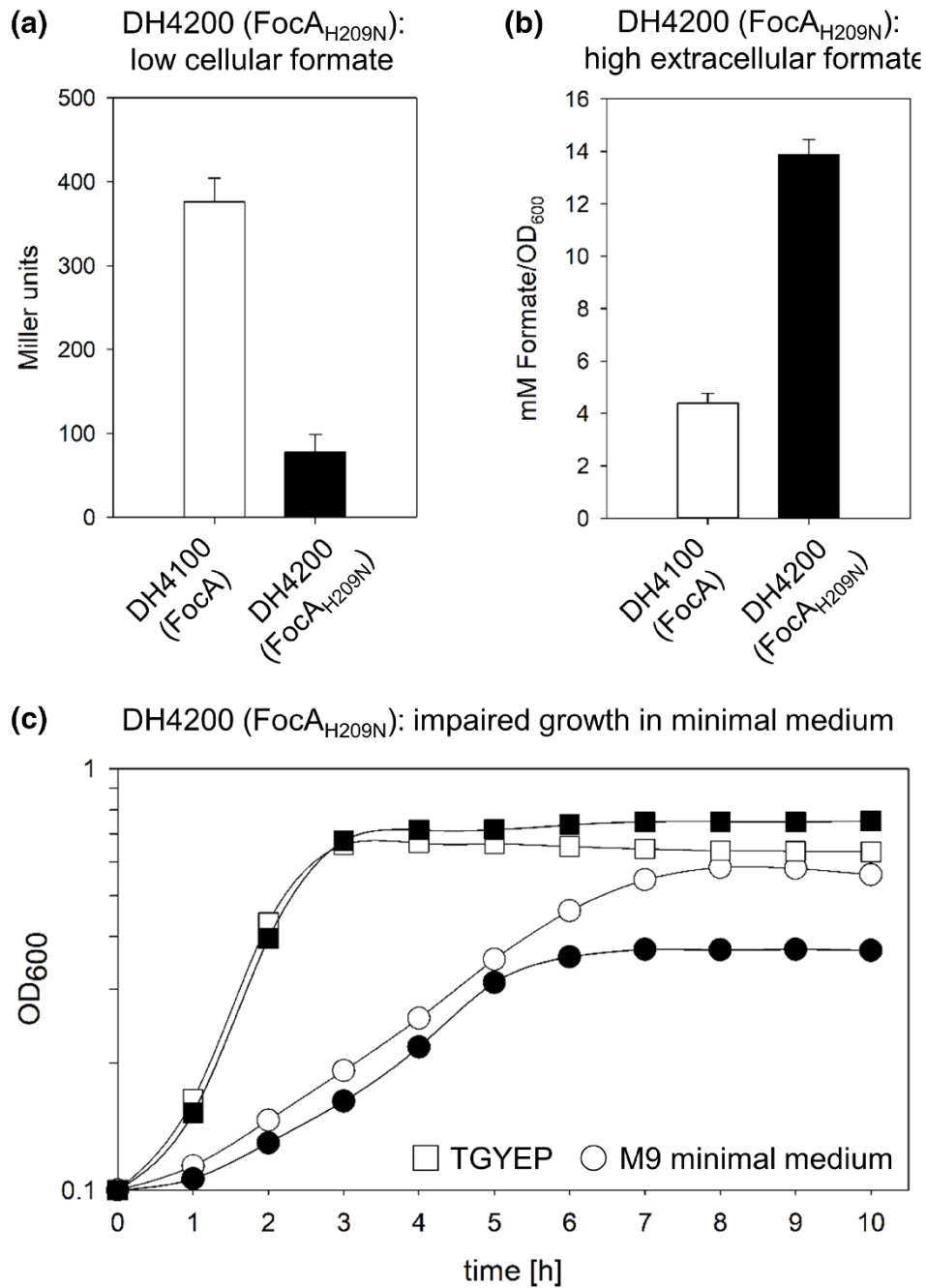


Fig. 6. DH4200 ($FocA_{H209N}$) is deficient in formate uptake and exhibits reduced anaerobic growth in minimal medium. Strain DH4200 ($FocA_{H209N}$) was characterized with respect to both intra- and extracellular formate levels and its growth phenotype. (a) β -Galactosidase enzyme activity of DH4100 and DH4200 was analysed for cells grown anaerobically in glucose-M9-minimal medium. (b) The concentration of formate in the culture medium was determined by HPLC analysis. (c) The respective strains, DH4100 (closed symbols) and DH4200 (open symbols), were grown anaerobically in glucose-M9-minimal medium (circles) and rich medium TGYEP (squares), both supplemented with 0.8% (w/v) glucose as carbon source. All experiments were performed with minimally three biological replicates, with each assay performed in duplicate.

Native FocA activity overrides H209N variant

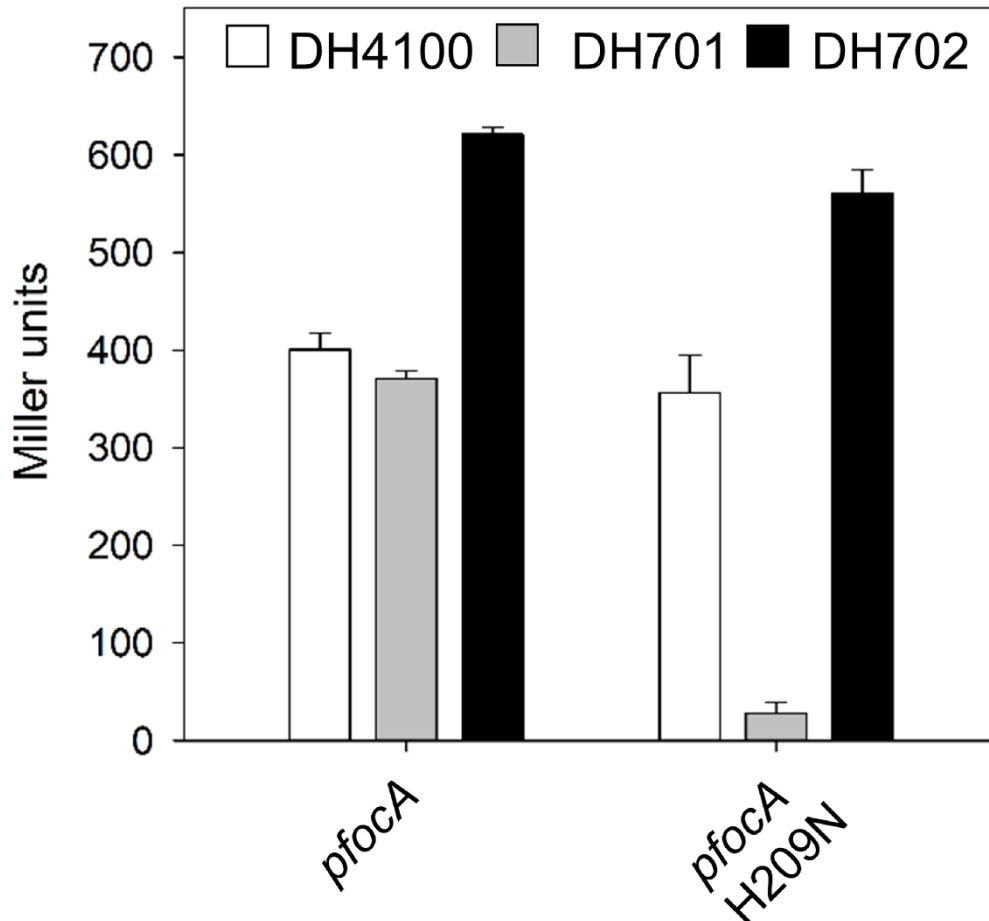


Fig. 7. Native FocA shows dominance over the N209 exchange variant. Determination of β -galactosidase enzyme activity after anaerobic growth of the wild-type strain DH4100 (black histogram), the *focA* mutant DH701 (no FocA synthesized, grey histogram) and strain DH702 (10-fold elevated FocA levels; white histogram) transformed with a plasmid carrying a gene encoding either native FocA or FocA_{H209N}. The strains were grown anaerobically in glucose-M9-minimal medium. The experiment was performed with minimally three biological replicates.

added. Thus, exogenously added formate caused accumulation of a higher intracellular formate concentration in cells synthesizing native FocA, compared with that produced from glucose alone; however, strains synthesizing FocA variants with an amide residue replacing H209 were either unable to take up this additional formate or to retain it in the cell. Remarkably, any formic acid that diffused across the cytoplasmic membrane (pK_a of formate/formic acid=3.75) into cells was also translocated out by FocA_{H209N} or FocA_{H209Q}, because these cells had a considerably lower β -galactosidase enzyme activity than strain DH701 lacking any FocA (Fig. 2b). Together, these findings suggest that FocA channels with an asparagine or glutamine residue instead of H209 in the pore immediately translocate formate from the cell and fail to take up formate.

Cells synthesizing FocA_{H209N} do not evolve H₂

As a final proof that formate failed to accumulate in cells synthesizing FocA_{H209N} or FocA_{H209Q}, we determined H₂ production after fermentative growth. H₂ is produced from formate by the FHL complex, whose synthesis requires accumulation of intracellular formate to low millimolar concentrations in order to induce expression of the corresponding structural genes, e.g. *fdhF* [3, 35]. Therefore, H₂ evolution was monitored in cultures of DH701 (*focA*) synthesizing either native FocA, FocA_{H209N} or FocA_{H209Q} after

growth to the late exponential phase, and this was compared to levels of H₂ evolution in DH701 cells, which do not synthesize FocA (Fig. 2d). The results clearly demonstrated that the strain with FocA_{H209N} or FocA_{H209Q} showed no detectable H₂ production during glucose fermentation, while the other two strains (DH701 and DH701/pfocA) produced more than 90 μmol of H₂ OD₆₀₀⁻¹. Together, these findings confirm that the FocA_{H209N} or FocA_{H209Q} variant allows strains to maintain an intracellular formate concentration below the threshold necessary to induce *fdhF_p::lacZ* expression, and concomitantly FHL complex synthesis, at least until the late exponential phase.

FocA_{H209N} prevents intracellular formate accumulation throughout growth

In growing, fermenting *E. coli*, formate is initially translocated out of the cell, but towards the late exponential growth phase the anion is re-imported as a substrate for the FHL complex [6, 23]. To assess how the FocA_{H209N} variant impacts intra- and extracellular formate levels during anaerobic batch-culture growth, we simultaneously monitored expression of *fdhF_p::lacZ* as β-galactosidase enzyme activity, determined extracellular formate levels and measured the pH of the culture medium (Fig. 3). We also monitored glucose consumption and lactate production (Fig. S3). In strain DH701 synthesizing native FocA, β-galactosidase enzyme activity already registered a level of approximately 700 Miller units after 1 h of growth (Fig. 3a). This initially high level of *lacZ* expression was presumably due to extant gene expression from the stationary-phase culture used for inoculation, coupled with calculations including the low cell density at the beginning of growth. As growth proceeded, the β-galactosidase activity slowly decreased until the mid-exponential phase of growth, where it then increased steadily peaking after approximately 6 h. This indicated production and accumulation of formate within these cells, which induced gene expression and hence increased enzyme activity. After 6 h, β-galactosidase enzyme activity steadily decreased for the next ~6 h, until a 3-fold lower level than that in the late-exponential phase of growth was measured (Fig. 3a). Maximal *lacZ* expression levels, along with the subsequent corresponding shift to lower β-galactosidase enzyme activity, occurred when the pH of the culture medium was approximately 6.5 (Fig. 3e). Analysis of extracellular formate levels (Fig. 3e) in the culture medium revealed a peak at around 5–6 h, and, thereafter, formate levels began slowly to decrease as formate was re-imported into the cells. This disappearance of formate from the culture medium correlated with the reduction in intracellular β-galactosidase enzyme activity and was due to formate consumption by the FHL complex [1, 6].

Glucose was completely consumed by strain DH701/pfocA after 7–8 h, correlating with entry into the stationary phase (Fig. S3a). Additionally, we monitored the extracellular concentrations of other organic acids produced during mixed-acid fermentation, as exemplified for lactate, which maintained a continuous, steady increase in concentration throughout growth (Fig. S3a). Whereas the changes in formate levels were dependent on pH and the growth phase and further metabolism, lactate (pK_a=3.86) levels were not.

When the same experiment was repeated with strain DH701 lacking any FocA, it was immediately evident that *fdhF_p::lacZ* expression started from a similarly high level, as for DH701 synthesizing native FocA, but β-galactosidase enzyme activity continued to increase to much higher levels by the time cells reached the mid-exponential phase of growth (Fig. 3b; approx. 3 h). This indicated accumulation of intracellular formate. Moreover, the kinetics of *fdhF_p::lacZ* expression were markedly different, particularly because the peak of β-galactosidase enzyme activity was attained earlier in the growth phase and the decrease in *fdhF_p::lacZ* expression began at a pH of 6.9 (Fig. 3b). Formate accumulation in the growth medium peaked around 6 h (Fig. 3f). Nevertheless, even in the absence of FocA, all of the formate ultimately was taken up by the cell (Fig. 3f). Glucose utilization was similar in DH701 to that in DH701/pfocA (Fig. S3b). Together, these findings suggest a FocA-independent mechanism exists for formate efflux and uptake in a strain lacking FocA, compared to when FocA is present.

A very different *fdhF_p::lacZ* expression profile was observed during growth of DH701 synthesizing FocA_{H209N} (Fig. 3c). Only very low β-galactosidase enzyme activity could be measured throughout the growth phase, and this was at least 10-fold lower than when DH701 synthesized native FocA (compare Fig. 3c with 3a). Formate was translocated into the growth medium, but was not taken up into the cells, instead accumulating extracellularly to levels that were more than 4-fold higher (with respect to OD₆₀₀) than for cells synthesizing the native FocA protein (Fig. 3g). It was noted that the final cell density of DH701 synthesizing FocA_{H209N} was significantly lower (~35% reduction) (Fig. 3c) than the parental strain DH701 (Fig. 3b). Despite the decrease in pH of the culture medium below 6.5 after 4 h, no formate uptake by the strain synthesizing FocA_{H209N} occurred.

Analysis of glucose utilization and lactate production by DH701 synthesizing FocA_{H209N} revealed similar kinetics for both metabolites, compared with the parental strain (Fig. S3c). Glucose was, however, not completely consumed by DH701/FocA_{H209N}, while lactate production started slightly earlier compared with DH701 or DH701 synthesizing native FocA.

To demonstrate that FocA_{H209N} does not take up formate, we introduced plasmid pfocAH209N into strain DH601 [20], which cannot activate PflB and consequently fails to make formate intracellularly. After anaerobic growth in glucose-minimal medium supplemented with 20 mM formate, essentially only a very low β-galactosidase enzyme activity could be measured for FocA_{H209N}, while native FocA synthesized in the same strain induced an ~33 fold higher β-galactosidase enzyme activity (Fig. 4). This result suggests strongly that the FocA variant with the H209N-exchange failed to import formate into anaerobic *E. coli* cells and that any formic acid entering the cell by passive diffusion was immediately translocated out of the cytoplasm by FocA_{H209N}.

Strain DH701 synthesizing FocA_{H209N} is impaired in import of hypophosphite

The toxic formate analogue hypophosphite is strongly reducing, and with a $pK_a=1.1$ cannot be readily taken up by cells by passive diffusion. Like formate, however, hypophosphite can be taken up into *E. coli* cells by FocA, and causes impaired anaerobic growth by inactivating PflB [4, 6, 26, 36]. Therefore, determination of the hypophosphite-sensitive growth phenotype indirectly indicates whether hypophosphite can be imported by FocA variants, because mutants lacking FocA, or uptake-inactivated FocA variants, show a hypophosphite-resistant phenotype [6, 20]. The reduction in growth rate attained after fermentative growth of DH701 (*focA*) upon addition of 0.5 mM hypophosphite was negligible (~2%) compared with growth in the absence of hypophosphite. This indicates an inability to import hypophosphite due to lack of FocA (Fig. 5). Introduction of the native *focA* gene on plasmid pfocA into DH701 restored the hypophosphite-sensitivity phenotype, whereby the growth rate was reduced by approximately 46%, indicating FocA-dependent hypophosphite uptake (Fig. 5). In contrast, and compared to growth in the absence of hypophosphite, only a low further hypophosphite-dependent reduction (6%) in growth rate of strain DH701 synthesizing FocA_{H209N} was observed (Fig. 5). The growth rate of the strain synthesizing FocA_{H209N} in the presence of hypophosphite was nevertheless still higher than that synthesizing native FocA. These findings demonstrate that uptake of hypophosphite by FocA_{H209N} is strongly impaired and fails to result in toxicity to the cells.

Formate efflux by a strain synthesizing the FocA_{H209N} variant depends on the N-terminal domain

It was recently shown that the soluble, cytoplasmic N-terminal domain of FocA is essential for effective channel function [20]. To determine whether the N-terminal domain is also important for the formate efflux function of the FocA_{H209N} variant, a new *focA* gene variant was constructed in which the coding sequence for the N-terminal domain was deleted, along with the altered codon-209 within the *focA* gene (see Methods). Introduction of plasmid pfocAH209N-ΔK2-P31 into DH701 and analysis of *fdhF_p::lacZ* gene expression during fermentative growth with glucose showed that the strain accumulated formate within the cell, resulting in a high β-galactosidase enzyme activity of 1300 Miller units in the late exponential phase (Fig. 3d). This activity was comparable to that obtained for strains DH701 (lacking FocA) and DH701/pfocAΔK2-P31 (Fig. S2). This contrasts sharply with the barely detectable β-galactosidase enzyme activity throughout the growth phase when FocA_{H209N} was synthesized in strain DH701 (compare Fig. 3c).

Removal of the N-terminal domain of FocA causes some destabilization of the pentamer in the membrane, which results in less protein being detectable [20]. To ensure that sufficient FocA_{H209N-ΔK2-P31} was synthesized in DH701, the experiment was repeated with supplementation of AHT to the growth medium when cells entered the early exponential growth phase. AHT induced expression of the cloned *focA* gene on pfocAH209N-ΔK2-P31 (Fig. 3d, compare Fig. S1c). The profile of β-galactosidase enzyme activity was similar to that after growth without AHT addition, with the exception that activity remained at around 400 units well into the stationary phase. Supplementation of AHT to the DH701/pfocAH209N culture had no effect on β-galactosidase enzyme activity, which remained very low throughout growth (Fig. 3c). Analysis of formate levels in the medium during growth of DH701/pfocAH209N-ΔK2-P31 without AHT addition revealed that the formate concentration was considerably lower than for strain DH701 synthesizing FocA_{H209N} (Fig. 3h). While addition of AHT increased the level of excreted formate in strain DH701/pfocAH209N-ΔK2-P31 to a level comparable to that of DH701 synthesizing native FocA (compare Fig. 3f, h), it also stressed the cells, as reflected by the significantly poorer growth. The excreted formate level was approximately 35% lower than the level excreted by DH701 synthesizing FocA_{H209N} (compare Fig. 3f with 3h). These results show that the soluble N-terminal domain of FocA is necessary for the amide amino acid variant to efflux formate efficiently.

Reduced growth of a strain synthesizing FocA_{H209N} is due to carbon loss

It is evident that the final cell density attained by strain DH701 (*focA*) carrying plasmid pfocAH209N was ~35% lower (Fig. 3c) than the same strain transformed with pfocA bearing the native *focA* gene (see e.g. Fig. 3a). This reduced growth could be due to either carbon limitation (e.g. loss of formate) or ion loss, e.g. ion leakage through the pore of the FocA_{H209N} variant. To distinguish between these possibilities, we exchanged the codon 209 of *focA* on the genome of strain DH4100 for an asparagine codon, delivering strain DH4200 (see Table S1 and Methods). First, we determined *fdhF_p::lacZ* expression of the strain after anaerobic growth to the exponential phase (Fig. 6a) and observed a similar phenotype in terms of β-galactosidase enzyme activity to that for strain DH701 transformed with pfocAH209N (compare with Fig. 2b). Moreover, increased levels of formate were excreted into the growth medium by strain DH4200, relative to the levels excreted by DH4100 (synthesizing native FocA) (Fig. 6b). The final optical density attained after fermentative growth of strain DH4200 in minimal-glucose medium synthesizing chromosomally encoded FocA_{H209N} was significantly reduced compared with the parental strain DH4100 (Fig. 6c). This difference in growth between the two strains was, however, alleviated by cultivation of the strain in rich medium (Fig. 6c). Aerobic growth of strains DH4200 and DH4100 in minimal-glucose medium was indistinguishable (Fig. S4), which is consistent with lack of *focA* gene expression in the presence of oxygen [6]. Together, these findings suggest that the reduced growth of strain DH4200 might be due to carbon (CO₂) loss through formate efflux by FocA_{H209N}.

Native FocA exhibits phenotypic dominance over FocA_{H209N}

All the data presented so far indicate that the FocA_{H209N} and FocA_{H209Q} variants function exclusively as formate efflux channels. Because the vast majority of FNT-family members have a histidine residue within their translocation pore (Fig. 1b), this suggests strong selective pressure maintains histidine at this position. To provide evidence in support of this notion, we introduced plasmid pfoAH209N into the parental strain DH4100, as well as into the *focA* mutant DH701. In agreement with previous findings, measurement of β -galactosidase enzyme activity revealed that in DH701 synthesizing FocA_{H209N} β -galactosidase activity was barely detectable (Fig. 7). When FocA_{H209N} was synthesized in strain DH4100, additionally synthesizing chromosomally encoded native FocA, β -galactosidase enzyme activity was ≥ 13 fold higher, and in the range of that determined for native FocA synthesized in this genetic background (Fig. 7). To confirm this apparent dominance effect of native FocA over FocA_{H209N}, we also introduced pfoAH209N into strain DH702 (Table S1), which produces approximately 10-fold more chromosomally encoded native FocA [6]. A similarly high level of β -galactosidase enzyme activity to that in DH4100 was measured, indicating that the strong formate efflux activity of FocA_{H209N} was overcome by the presence of native FocA in the same cell (Fig. 7). Taken together, these results indicate that chromosomally encoded, native FocA with a histidine residue within the pore overrides the efflux activity of FocA_{H209N} and re-imports formate to a concentration sufficient to induce expression of the *fdhF_p::lacZ* gene fusion. This further supports our contention that H209 within the pore of FocA is essential for formate uptake.

DISCUSSION

The histidine residue in the translocation pore is required for formate uptake by FocA

We show in this study that the centrally located H209 residue within the pore of FocA is essential for efficient, pH-dependent formate uptake into the *E. coli* cell, but is dispensable for formate efflux. This suggests that the protonated imidazolium cation of H209 is required for uptake of formate. This was demonstrated by exchanging the central H209 for a non-protonatable amide amino acid residue, generating an exclusive formate efflux channel, which was not competent to import formate or its chemical analogue hypophosphite. A previous study showed that exchange of H209 with a tyrosine residue caused intracellular formate accumulation [21], suggesting that exchanging H209 with a large, uncharged aromatic side-chain sterically blocks the pore, impeding formate efflux. Nevertheless, by exchanging the side-chain of histidine with that of a smaller, amide side-chain our results demonstrate that the histidine residue at position 209 is not essential for formate efflux and indicates that the mechanisms of formate efflux and influx through FocA are different, despite using the same pore.

Our findings also reconcile aspects of previous mechanistic proposals with respect to the dielectric environment facilitating anion passage [22], and with respect to protonation of H209 possibly transiently transferring the proton to formate [17, 18, 37]. Either of these proposals could theoretically explain passage of formate through the hydrophobic core of FocA. Clearly, however, we establish that H209 does not only have a structural role within the pore, as previously proposed [19, 22]. Rather, our *in vivo* data demonstrate that formate or hypophosphite uptake by native FocA only occurs when histidine (and presumably the imidazolium cation) is present. Whether the proposal that the H209–T91–H₂O network allows H⁺ recycling to allow passage of the anion through the hydrophobic core of the channel [17, 18] cannot be concluded based on the current study, but will require further experimental analysis.

From a physiological perspective, formate:proton symport would not be energetically beneficial to a fermenting bacterium, due to the dissipation of *pmf*. Although mechanistically challenging, it is conceivable that the strongly positively charged imidazolium side-chain in the hydrophobic environment of the pore [37] might be capable of drawing the formate (and hypophosphite) anion through the pore by coulombic attraction. This would not require H⁺-recycling, but would nevertheless necessitate protonation of the histidine residue and a mechanism for further translocation of the anion into the cytoplasm. This latter might involve the cytoplasmically localized N-terminal domain of FocA, which interacts with PflB [20, 30], possibly inducing a conformational change aiding release of formate into the cytoplasm. This hypothesis needs to be tested in future studies.

FocA_{H209N} synthesis prevents hydrogen production

The H₂-negative phenotype of DH701/pfoAH209N and DH4200 arises most likely because the strain does not make an FHL complex [5]. Expression of the *fdhF* and *hyc* genes, which encode the structural components of the FHL complex [2, 3, 5], is induced only when formate is present at low millimolar concentrations within the cell [1, 5]. This, in turn, is because the formate-responsive transcription factor, FhlA, has an apparent K_m for formate of 5 mM [35]. Assuming FocA_{H209N} functions as an anion channel [38], invoking Nernstian behaviour [39], and a membrane potential difference of approximately –140 mV [40], then if the external formate concentration is 20 mM, the intracellular concentration of formate will never exceed the low micromolar range, i.e. several orders of magnitude below that required to be sensed by FhlA. The efficacy of FocA_{H209N} in anion efflux is exemplified by the fact that even with a pK_a of 3.75 for formate, and adding a further 20 mM exogenous formate, this still failed to result in induction of *fdhF* expression (Fig. 2b). This is markedly different for the histidine-bearing (native)

FocA channel, which, together with an induced and active FHL complex, enables the fermenting cell to exert much greater fine control of intracellular formate levels.

Is formate an important reservoir of CO₂ for anaerobic *E. coli* cells?

We made the unexpected observation that anaerobic growth of a strain synthesizing the FocA_{H₂O₉N} variant (e.g. strain DH4200) grew significantly more poorly than either the parental strain DH4100 or the *focA* mutant, DH701. This growth deficiency of DH4200 could, however, be circumvented by cultivation of the strain in rich medium. While this growth recovery in rich medium suggests that loss of cellular carbon might be the cause of the phenotype, it is also conceivable that this effect is the result of an imbalance in membrane potential due to excessive anion loss. Moreover, formate is not known to be utilized by wild-type *E. coli* as a growth substrate [3, 41]; however, it might be able to augment levels of CO₂ necessary for heterotrophic CO₂ fixation. It is known that CO₂ released by the activity of decarboxylases is re-utilized by cellular carboxylases, explaining why mutants lacking carbonic anhydrase can only grow under high partial pressure of CO₂ [42]. Nevertheless, an unequivocal explanation for the growth defect of strain DH4200 will require further experimentation.

The question of FocA mechanism and the bioenergetics of fermentation

A further advantage of the controlled efflux and influx of formate in native FocA would be that, even if uptake of formate is in symport with that of H⁺, the production of gaseous H₂ would effectively remove this proton from the cytoplasm, balancing *pmf* through the possibility of periplasmic re-oxidation of H₂ [1–3]. This is energetically beneficial for the cell even though the FHL complex (Hyc-based components) cannot additionally pump protons [2], especially if FocA influxes formate and not formic acid. Importantly, in the efflux direction, due to the fact that H₂O₉ is dispensable for this function, it is likely that formate:H⁺ co-translocation occurs, thus contributing to *pmf*, which also supports the proposal that this occurs when the histidine is not protonated. This is based on the fact that the hydrophobicity of the core of the FocA pore would not permit ion passage [37, 43]. This would be in analogy to what has been demonstrated for lactate:proton symport in the lactic acid bacteria [44]. The formate regulon [5] thus combines intracellular formate-sensing, formate-regulated gene expression, formate disproportionation and ultimately substrate translocation to poise exquisitely the utilization of this valuable electron donor and carbon source [1–3]. Understanding how FocA controls cellular formate levels also helps to explain how formate-dependent ‘adaptive’ enzyme synthesis works, as originally proposed by Stephenson and Stickland [45].

What is the explanation for the 1% of FNTs that escape selective pressure to maintain a histidine residue?

In the comparatively few examples of naturally occurring FNT channels that have an amide amino acid residue in place of the central histidine, it can be proposed that these channels have evolved to act as unidirectional anion efflux channels. Examples include NirC-like nitrite channels in the anammox-utilizing *Planctomycetes* [46], a lactate channel in the protozoan pathogen *Entamoeba histolytica* [19] and FNT channels of unknown anion specificity in certain pathogenic firmicutes. The prevalence of FNT channels with a central histidine in the pore seems to be due to the selective advantage afforded by pH-controlled, bidirectional anion translocation. Generally, the broad distribution of FNT channels in anaerobes suggests an ancient evolutionary origin for these membrane proteins [7]. The structural and mechanistic parallels between FNTs and aqua- and glyceroporins [47, 48], including the key role of a protonatable histidine residue within the translocation pore [49], supports the view that these channels may represent a remarkable example of convergent evolution.

Funding information

This work received no specific grant from any funding agency.

Acknowledgements

We thank Dörte Falke for initial molecular biological experiments. This work was supported by the Martin-Luther University of Halle-Wittenberg and Federal State Saxony-Anhalt.

Author contributions

M.K. and O.T. carried out the experiments. M.K., C.P. and R.G.S. designed the experiments and M.K., O.T., C.P. and R.G.S. analysed the data. M.K. and R.G.S. drafted the manuscript and conceived the study. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

1. Sawers RG. Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans* 2005;33:42–46.
2. Sargent F. The Model [NiFe]-Hydrogenases of *Escherichia coli*. *Adv Microb Physiol* 2016;68:433–507.
3. Pinske C, Sawers RG. Anaerobic formate and hydrogen metabolism. *EcoSal Plus* 2016;7.
4. Knappe J, Sawers G. A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* 1990;6:383–398.

5. Rossmann R, Sawers G, Böck A. Mechanism of regulation of the formate-hydrogenlyase pathway by oxygen, nitrate, and pH: definition of the formate regulon. *Mol Microbiol* 1991;5:2807–2814.
6. Suppmann B, Sawers G. 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* 1994;11:965–982.
7. Mukherjee M, Vajpai M, Sankararamkrishnan R. Anion-selective Formate/nitrite transporters: taxonomic distribution, phylogenetic analysis and subfamily-specific conservation pattern in prokaryotes. *BMC Genomics* 2017;18:560.
8. Wang Y, Huang Y, Wang J, Cheng C, Huang W, et al. Structure of the formate transporter FocA reveals a pentameric aquaporin-like channel. *Nature* 2009;462:467–472.
9. Waight AB, Love J, Wang D-N. Structure and mechanism of a pentameric formate channel. *Nat Struct Mol Biol* 2010;17:31–37.
10. Lü W, Du J, Wacker T, Gerbig-Smentek E, Andrade SLA, et al. pH-dependent gating in a FocA formate channel. *Science* 2011;332:352–354.
11. Lü W, Schwarzer NJ, Du J, Gerbig-Smentek E, Andrade SLA, et al. Structural and functional characterization of the nitrite channel NirC from *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:18395–18400.
12. Czyzewski BK, Wang D-N. Identification and characterization of a bacterial hydrosulphide ion channel. *Nature* 2012;483:494–497.
13. Wu B, Rambow J, Bock S, Holm-Bertelsen J, Wiechert M, et al. Identity of a Plasmodium lactate/H(+) symporter structurally unrelated to human transporters. *Nat Commun* 2015;6:6284.
14. Golldack A, Henke B, Bergmann B, Wiechert M, Erler H, et al. Substrate-analogous inhibitors exert antimalarial action by targeting the Plasmodium lactate transporter PfFNT at nanomolar scale. *PLoS Pathog* 2017;13:e1006172.
15. Zeng JM, Hapuarachchi SV, Shafik SH, Martin RE, Kirk K, et al. Identifying the major lactate transporter of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Sci Rep* 2021;11:6787.
16. Lyu M, Su C-, C, Kazura JW, Yu EW. Structural basis of transport and inhibition of the Plasmodium falciparum transporter PfFNT. *EMBO Rep* 2021;22:e51628.
17. Waight AB, Czyzewski BK, Wang D-. N. Ion selectivity and gating mechanisms of FNT channels. *Curr Opin Struct Biol* 2013;23:499–506.
18. Lü W, Du J, Schwarzer NJ, Wacker T, Andrade SLA, et al. The formate/nitrite transporter family of anion channels. *Biol Chem* 2013;394:715–727.
19. Helmstetter F, Arnold P, Höger B, Petersen LM, Beitz E. Formate-nitrite transporters carrying nonprotonatable amide amino acids instead of a central histidine maintain pH-dependent transport. *J Biol Chem* 2019;294:623–631.
20. Kammel M, Hunger D, Sawers RG. The soluble cytoplasmic N-terminal domain of the FocA channel gates bidirectional formate translocation. *Mol Microbiol* 2021;115:758–773.
21. Hunger D, Doberenz C, Sawers RG. Identification of key residues in the formate channel FocA that control import and export of formate. *Biol Chem* 2014;395:813–825.
22. Wiechert M, Beitz E. Mechanism of formate-nitrite transporters by dielectric shift of substrate acidity. *EMBO J* 2017;36:949–958.
23. Beyer L, Doberenz C, Falke D, Hunger D, Suppmann B, et al. Coordination of FocA and pyruvate formate-lyase synthesis in *Escherichia coli* demonstrates preferential translocation of formate over other mixed-acid fermentation products. *J Bacteriol* 2013;195:1428–1435.
24. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd edn. NY (Cold Spring Harbor Laboratory, NY): Cold Spring Harbor; 1989.
25. Begg YA, Whyte JN, Haddock BA. The identification of mutants of *Escherichia coli* deficient in formate dehydrogenase and nitrate reductase activities using dye indicator plates. *FEMS Microbiol Lett* 1977;2:47–50.
26. Falke D, Schulz K, Doberenz C, Beyer L, Lilie H, et al. 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* 2010;303:69–75.
27. Hamilton CM, Aldea M, Washburn BK, Babitzke P, Kushner SR. New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1989;171:4617–4622.
28. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–685.
29. Schägger H, von Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 1991;199:223–231.
30. Doberenz C, Zorn M, Falke D, Nannemann D, Hunger D, et al. Pyruvate formate-lyase interacts directly with the formate channel FocA to regulate formate translocation. *J Mol Biol* 2014;426:2827–2839.
31. Miller J. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 1972.
32. Pinske C. The ferredoxin-like proteins HydN and YsaA enhance redox dye-linked activity of the formate dehydrogenase H component of the formate hydrogenlyase complex. *Front Microbiol* 2018;9:1238.
33. Pravda L, Sehnal D, Toušek D, Navrátilová V, Bazgier V, et al. MOLE-online: a web-based tool for analyzing channels, tunnels and pores (2018 update). *Nucleic Acids Res* 2018;46:W368–W373.
34. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* 2004;14:1188–1190.
35. Hopper S, Böck A. Effector-mediated stimulation of ATPase activity by the sigma 54-dependent transcriptional activator FHLA from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1995;177:2798–2803.
36. Plaga W, Frank R, Knappe J. Catalytic-site mapping of pyruvate formate lyase. Hypophosphite reaction on the acetyl-enzyme intermediate affords carbon-phosphorus bond synthesis (1-hydroxyethylphosphonate). *Eur J Biochem* 1988;178:445–450.
37. Atkovska K, Hub JS. Energetics and mechanism of anion permeation across formate-nitrite transporters. *Sci Rep* 2017;7:12027.
38. Theobald DL, Miller C. Membrane transport proteins: surprises in structural sameness. *Nat Struct Mol Biol* 2010;17:2–3.
39. Armstrong CM. Packaging life: the origin of ion-selective channels. *Biophys J* 2015;109:173–177.
40. Bot CT, Prodan C. Quantifying the membrane potential during *E. coli* growth stages. *Biophys Chem* 2010;146:133–137.
41. Thauer RK, Kirchner FH, Jungermann KA. Properties and function of the pyruvate-formate-lyase reaction in clostridia. *Eur J Biochem* 1972;27:282–290.
42. Merlin C, Masters M, McAteer S, Coulson A. Why is carbonic anhydrase essential to *Escherichia coli*? *J Bacteriol* 2003;185:6415–6424.
43. Lv X, Liu H, Ke M, Gong H. Exploring the pH-dependent substrate transport mechanism of FocA using molecular dynamics simulation. *Biophys J* 2013;105:2714–2723.
44. ten Brink B, Otto R, Hansen UP, Konings WN. Energy recycling by lactate efflux in growing and nongrowing cells of *Streptococcus cremoris*. *J Bacteriol* 1985;162:383–390.

45. Stephenson M, Stickland LH. Hydrogenlyases: Bacterial enzymes liberating molecular hydrogen. *Biochem J* 1932;26:712–724.
46. Smeulders MJ, Peeters SH, van Alen T, de Bruijckere D, Nuijten GHL, *et al.* Nutrient limitation causes differential expression of transport- and metabolism genes in the compartmentalized anammox bacterium *Kuenenia stuttgartiensis*. *Front Microbiol* 2020;11:1959.
47. Fu D, Libson A, Miercke LJ, Weitzman C, Nollert P, *et al.* Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science* 2000;290:481–486.
48. Sui H, Han BG, Lee JK, Walian P, Jap BK. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature* 2001;414:872–878.
49. Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, *et al.* Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* 2002;542:3–16.

Edited by: T. Palmer

Five reasons to publish your next article with a Microbiology Society journal

1. The Microbiology Society is a not-for-profit organization.
2. We offer fast and rigorous peer review – average time to first decision is 4–6 weeks.
3. Our journals have a global readership with subscriptions held in research institutions around the world.
4. 80% of our authors rate our submission process as 'excellent' or 'very good'.
5. Your article will be published on an interactive journal platform with advanced metrics.

Find out more and submit your article at microbiologyresearch.org.

Kapitel 3 – Bedeutung der Interaktion von T91 und H209 in FocA

- III) Interplay between the conserved pore residues Thr-91 and His-209 controls formate translocation through the FocA channel – *Microbial Physiology 2022*

Zusammenfassung Publikation III

Im Zentrum dieser Publikation stand die Bedeutung der Interaktion der zwei sehr hoch konservierten Aminosäuren der Translokationspore der FNTs: T91 und H209 (bezogen auf die Nummerierung von *E. coli* FocA).

Im Rahmen dieser Studie wurde eine Vielzahl von H209, T91 und kombinatorischen FocA-Varianten erstellt und deren Einfluss auf die bidirektionale Formiat/Ameisensäure-Translokation evaluiert. Mit Ausnahme der kombinatorischen FocA_{T91A H209A}-Variante, welche weniger stabil war, wurden alle Varianten synthetisiert und in der Membranfraktion nachgewiesen. Um die Transportaktivität zu untersuchen, wurde eine Kombination des β -Galaktosidase assays zur Bestimmung des intrazellulären Formiat-Levels, HPLC-Analytik zum Quantifizieren der extrazellulären Formiat-Konzentration und Wachstumsinhibierungsanalysen mit Hypophosphit zur Beurteilung der Importaktivität, durchgeführt. Die Studien zeigten, dass einzelne FocA_{H209}-Substitutionsvarianten einschließlich Alanin, Isoleucin und Threonin ähnlich wie zuvor für FocA_{H209N} nur in Exportrichtung Formiat-Permeation erlaubten (vgl. Kapitel 2). Wenn Histidin durch sterisch anspruchsvollere, saure oder basische Seitenketten ausgetauscht wurde und für die Komplementation der *focA*-Mutante DH701 eingesetzt wurde, konnte eine intrazelluläre Formiat-Akkumulation in der exponentiellen Wachstumsphase beobachtet werden. Bei zuletzt genannten Varianten zeigten Formiat-Influx-Analysen eine ähnliche intrazelluläre Formiat-Konzentration wie bei nativem FocA, jedoch konnte für die Varianten keine signifikante Aufnahme von Hypophosphit detektiert werden.

Bei der Analyse von FocA Threonin-Austauschvarianten, war die einzige Substitution, welche toleriert wurde und bei welcher die Formiat-Translokation ähnlich zum Parentalstamm funktionierte, die zu Serin. Zeitaufgelöste Studien zur Analyse der Formiat-Konzentration demonstrierten, dass FocA_{T91A} das zu translozierende Ion zunächst intrazellulär akkumulierte, ähnlich wie die *focA*-Mutante. FocA_{T91}-Austausche inhibierten auch den Hypophosphit-Import. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich die FocA_{T91S H209A}-Doppelaustauschvariante im Formiat-Efflux-Verhalten ähnlich wie das native Protein verhielt.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass sowohl chemische, als auch sterische Eigenschaften der Aminosäuren 209 und 91 die Formiat-Permeation bestimmten. Wie auch in den vorherigen Kapiteln zeigten sich je nach Transportrichtung mechanistische Unterschiede. Eine bidirektionale Ionen-Translokation konnte aber nur beobachtet werden, wenn H209 erhalten blieb und mit der Hydroxyl-Funktion der Aminosäure 91 über eine Wasserstoffbrückenbindung interagierte, was als essentiell für den Mechanismus postuliert wurde.

Interplay between the Conserved Pore Residues Thr-91 and His-209 Controls Formate Translocation through the FocA Channel

Michelle Kammel^a Oliver Trebbin^b Robert Gary Sawers^a^aInstitute for Biology/Microbiology, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany;^bIMD Laboratory Oderland GmbH, Frankfurt (Oder), Germany

Keywords

Formate translocation · Anion channel · FocA pore · Threonine-91 · Histidine-209

Abstract

The formate channel A (FocA) belongs to the formate-nitrite transporter (FNT) family, members of which permeate small monovalent anions. FocA from *Escherichia coli* translocates formate/formic acid bi-directionally across the cytoplasmic membrane during fermentative growth. Two residues are particularly well-conserved within the translocation pores of FNTs: threonine-91 and histidine-209, based on *E. coli* FocA numbering. These residues are located at the tips of two broken transmembrane helices and control anion passage. H209 is the only charged residue within the pore and interacts with T91. Here, we addressed the role of the T91-H209 interaction network in the permeation of formate in vivo through FocA by performing an extensive amino acid-exchange study. Monitoring changes in intracellular formate using a formate-responsive *fdhF_p::lacZ* reporter system revealed that T91 is essential for the ability of FocA to translocate formate bi-directionally. Only exchange for serine was partially tolerated, indicating that the hydroxyl group of T91

is mechanistically important. Substitution of H209 with N or Q was previously shown to convert FocA into a formate efflux channel. We show here that residue exchanges A, I, and T at this position resulted in a similar phenotype. Moreover, efflux function was confirmed for these FocA variants by measuring excreted formate in the culture medium. Substitution of bulky or charged residues for H209 prevented bi-directional formate passage. Studies using hypophosphite, a toxic analogue of formate taken up by FocA, and which causes impaired growth, confirmed that T91 and H209 substitutions essentially abolished, or drastically reduced, FocA's translocation activity, as shown by effects on growth rate. The exceptions were T91S- and T91Y-exchange variants that retained partial ability to take up inhibitory hypophosphite. Together, our findings indicate that T91 is essential for formate permeation in both directions; however, it is particularly important to allow anion efflux. Moreover, H209 is essential for formate uptake by FocA, strongly suggesting that protonation-deprotonation of this residue plays a role in formate uptake. Finally, our results substantiate the premise that efflux and influx of formate by FocA are mechanistically distinct processes that are controlled by the interplay between T91 and H209.

© 2022 The Author(s).
Published by S. Karger AG, BaselKarger@karger.com
www.karger.com/mip© 2022 The Author(s).
Published by S. Karger AG, BaselCorrespondence to:
Robert Gary Sawers, gary.sawers@mikrobiologie.uni-halle.de

Karger

OPEN ACCESS

This is an Open Access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-4.0 International License (CC BY-NC) (<http://www.karger.com/Services/OpenAccessLicense>), applicable to the online version of the article only. Usage and distribution for commercial purposes requires written permission.

Introduction

During mixed-acid fermentation *Escherichia coli* and other enterobacteria non-oxidatively cleave pyruvate to formate and acetyl-CoA using the glycyl-radical enzyme pyruvate formate-lyase (PflB) [Knappe and Sawers, 1990]. The bulk of the formate is translocated out of the cytoplasm to the periplasm by formate channel A (FocA) [Suppmann and Sawers, 1994; Kammel et al., 2021, 2022], which is the archetype of the formate-nitrite transporter (FNT) family of anion channels. FNT channels are found widely distributed among anaerobic microorganisms and each translocates a specific monovalent anion, usually either into or out of the cell [Wu et al., 2015; Mukherjee et al., 2017; Zeng et al., 2021]. FocA appears to be unusual in that it is able to translocate formate/formic acid in both directions, depending on the pH [Suppmann and Sawers, 1994; Beyer et al., 2013]; it is currently unresolved whether the acid or the conjugate base is translocated, and thus for convenience henceforth we will refer simply to formate, except where formic acid is specifically meant. At neutral pH formate is mainly translocated from the cytoplasm into the periplasm. But when the pH of the growth medium decreases substantially below 7, due to the accumulation of organic acids such as acetic acid, lactic acid, succinic acid, and mainly formic acid, the latter is taken back up into the cytoplasm. The reimport of formic acid would partially offset the acidification of the growth medium because once inside the cell its accumulation induces synthesis of the formate hydrogenlyase complex, which disproportionates it into dihydrogen and carbon dioxide [Sargent, 2016]. How FocA is able to control the direction of formate translocation is not completely understood, and is the focus of this study.

FNT channels are all homopentamers and they share a structural fold with the aqua- and glyceroporin family of channels [Sui et al., 2001; Lü et al., 2013; Waight et al., 2013]. Each protomer of the pentamer has a hydrophobic pore that has two constriction sites, which restrict anion access [Wang et al., 2009; Waight et al., 2010; Lü et al., 2011]. The pore is formed from two transmembrane alpha-helices (TM2 and TM5) that are each disrupted to form two shorter alpha-helices joined by a loop. The two loop-like structures are termed the Ω - and S-loops and are folded such that the tips of each converge from above and below the plane of the membrane, respectively [Wang et al., 2009] (Fig. 1a). The upper S-loop, located close to the periplasmic side of the membrane, is held rigidly in position, while the lower, converging Ω -loop, at the cytoplasmic side of the membrane, appears to be more flexi-

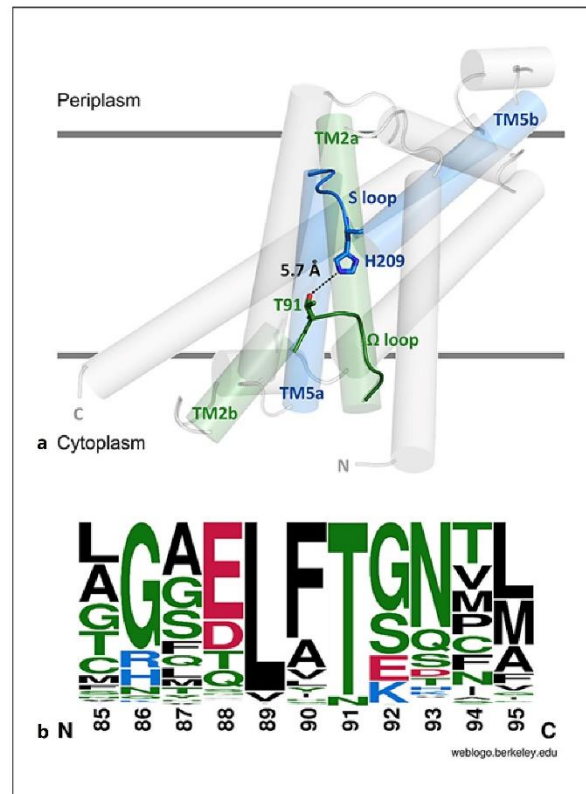


Fig. 1. Conservation of threonine residue 91 within the pore of FNT channels and interaction with histidine residue 209. **a** Depiction of the locations of T91 and H209 within the FocA pore (PDB structure 3KCU [Wang et al., 2009]). One of the protomers was visualized in cartoon representation with transmembrane helices depicted as cylinders. The residues T91 (green) and H209 (blue) are displayed in their stick representation and the adjoining transmembrane helices 2 and 5 (TM2/5 a and b) and both the Ω - and S-loops are highlighted in light green and light blue, respectively. The distance between H209's *pro*-N hydrogen and the hydroxyl-group of T91 was determined using PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, version 2.5, Schrödinger, LLC). **b** Conservation plot comparing the amino acid residues between positions 85 and 95 using 258 FNT channels, which were used to create a WebLogo 3 stacking plot ([Crooks et al., 2004]; see the Materials and Methods section). The residues are aligned with native FocA from *E. coli*. Amino acid residues displayed in black have an apolar side chain (A, F, I, L, M, P, V, W), while polar side chains are indicated in green (C, G, N, Q, S, T, Y). Acidic amino acids are shown in red (D, E) and basic amino acid residues are shown in blue (H, K, R). A similar stacking plot analysis for H209 has been presented previously [Kammel et al., 2022].

ble, and in FocA can adopt different positions within the pore. This suggests that the position of the Ω -loop might control anion access, i.e., through “opening” and “closing” of the pore [Lü et al., 2013; Waight et al., 2013]. The tip of each loop has a conserved amino acid residue, i.e., found in most FNT family members, suggesting a common mechanism governs all of these channels, irrespective of the permeating anion. The tip of the S-loop has a histidine residue (H209 in FocA of *E. coli*) and this represents the only charged amino acid residue within the core of the pore (Fig. 1a). The tip of the Ω -loop has a threonine residue (T91). Because H209 can be protonated ($pK_a = 6$), it has been proposed that protonation might be involved in the anion uptake mechanism and could explain the pH dependence of the inward permeation of formate through FocA [Suppmann and Sawers, 1994; Sawers, 2005]. Evidence in support of this proposal has been obtained recently, whereby exchange of the conserved H209 residue in FocA of *E. coli* for an asparagine or glutamine residue resulted in FocA functioning only in the efflux direction [Kammel et al., 2022]. Notably, there are a few examples of FNT channels with either N or Q at the tip of the S-loop, suggesting that they might be uni-directional channels for a particular anion.

Like H209 [Kammel et al., 2022], T91 is highly conserved within FNT channels (Fig. 1b). The functional role of T91 on the tip of the Ω -loop with respect to formate translocation by FocA is, however, unclear. Structural studies have shown that T91 can form a hydrogen bond with H209 [Waight et al., 2010; Lü et al., 2011, 2012], while the structures of other pores reveal it is separated from H209 by more than 5 Å. These observations have led to the suggestion that the position of T91 on the Ω -loop, and its proximity to, or interaction with, H209, might govern whether the pore is open or closed [Lü et al., 2013; Waight et al., 2013]. Notably, T91 also coordinates with a water molecule in the pore and this has led to the suggestion that the interplay among H209, T91, and the bound H₂O possibly influences the directionality of formate translocation [Lü et al., 2012]. Moreover, because uptake of the formate anion via a “channel” into the negatively charged cytoplasm would be thermodynamically challenging, coupled with the fact that the core of the pore is hydrophobic, this has led to the suggestion that uncharged formic acid is translocated into the cytoplasm [Wiechert and Beitz, 2017; Helmstetter et al., 2019]. However, this would reduce the proton gradient due to the symport of an H⁺ with each formate translocated. Consequently, in an alternative hypothesis, the H209-T91-H₂O network has been proposed to recapture the proton dur-

ing the passage of the undissociated acid [Lü et al., 2012], which would be more advantageous, in terms of energy conservation, for a fermenting bacterium.

In a previous mutagenesis study, we provided preliminary evidence in support of an important function for T91 in the translocation of formate by FocA [Hunger et al., 2014]. In the current study, we have carried out a more extensive analysis of the roles of T91 and H209 in formate translocation by *E. coli* FocA. Our findings demonstrate that the interplay between these two amino acid residues is crucial in governing the directional permeation of formate through FocA.

Results

Exchanging H209 for Either Ala, Asn, Gln, Ile, or Thr Converts FocA into an Efflux Channel for Formate

When either of the amide amino acid residues N or Q is introduced in place of histidine at amino acid position 209 in the core of the FocA pore, *E. coli* cells synthesizing these FocA variants very efficiently excrete formate during fermentation [Kammel et al., 2022]. To determine whether any other amino acid residue exchange at position H209 resulted in a similar FocA phenotype, we introduced codons into *focA* that decode as A, D, F, I, K, T, or W in place of H. The genes encoding these variants were introduced on a plasmid into the *focA* mutant DH701 (see online suppl. Tables S1 and S2 supplementary information; for all online suppl. material, see www.karger.com/doi/10.1159/000524454) and, after anaerobic growth, changes in formate-responsive *fdhF*::*lacZ* reporter expression within the cell were monitored. Thus, changes in levels of enzyme activity directly reflect relative changes in formate levels within the cell [Beyer et al., 2013]. In comparison to the β -galactosidase enzyme activity in DH701 synthesizing native FocA, cells synthesizing either the alanine, the isoleucine, or the threonine variant (FocA_{H209A}, FocA_{H209I}, or FocA_{H209T}, respectively), showed barely detectable levels of β -galactosidase enzyme activity, and thus had essentially no formate in the cells (Fig. 2a). Due to the fact that intracellular formate must accumulate to a low mM concentration in order to induce expression of the *fdhF* gene promoter [Hopper and Böck, 1995; Kammel et al., 2022], this result suggests that the intracellular formate concentration was below the threshold required to induce *fdhF* expression. This could be because formate was not made, or, more likely, because it was immediately translocated out of these cells by these FocA variants [Kammel et al., 2022]. To distin-

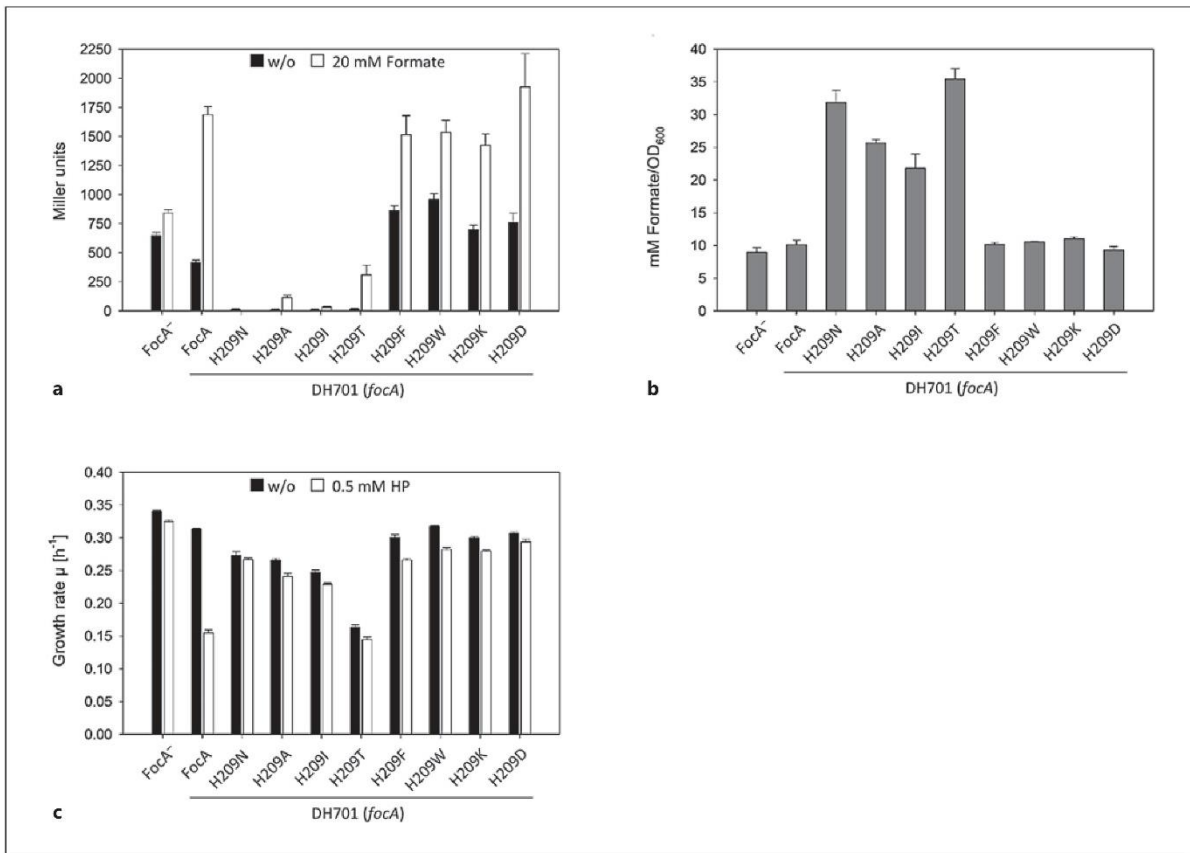


Fig. 2. Histidine-209 is essential for bi-directional formate translocation via FocA. Parameters determined to monitor formate translocation were investigated in the *focA* mutant DH701 (*focA*) and in DH701 transformed with plasmids carrying a *focA* gene encoding the indicated H209 variants. The negative control is labelled FocA⁻ and indicates the strain without FocA, while the positive control is labelled FocA, and indicates re-introduction of the parental FocA channel. Strains were grown anaerobically in glucose-M9-minimal medium (see the Materials and Methods section). **a** Formate-induced β -galactosidase enzyme activity of the respective strains was determined in cells grown to late-exponen-

tial phase without (black histogram) and with exogenously added 20-mM sodium formate (white histogram). Please see Kammel et al. [2022] for comparable values for DH4100 (wild type). **b** The concentration of formate in the culture medium after growth of the same strains shown in panel **a** was measured using HPLC analysis. **c** The sensitivity of the respective strains towards sodium hypophosphite was analysed by determination of anaerobic growth rates in the absence (black histograms) and in the presence of 0.5-mM sodium hypophosphite (white histograms). All experiments were performed with minimally three biological replicates, with each assay performed in duplicate.

guish between these alternatives, formate levels in the culture medium were determined (Fig. 2b). When DH701 synthesized either FocA_{H209A}, FocA_{H209I}, or FocA_{H209T} ~20–35-mM formate OD₆₀₀⁻¹ was measured in the growth medium, while the same strain synthesizing native FocA excreted less than 50% of this concentration (10.1 ± 0.7-mM formate OD₆₀₀⁻¹). As a control, the experiment was also performed with a culture of DH701 synthesizing Fo-

cA_{H209N}, which, as previously reported [Kammel et al., 2022], showed a phenotype similar to DH701 synthesizing FocA_{H209A}, FocA_{H209I}, or FocA_{H209T} (Fig. 2a, b).

Finally, it has been reported that when DH701 synthesizes the FocA_{H209N} variant, cells have a considerably reduced growth rate under fermentative conditions, which was suggested to be through the loss of a source of CO₂ for carboxylation reactions, due to formate efflux [Kam-

mel et al., 2022]. Analysis of the anaerobic growth rates for DH701 synthesizing either FocA_{H209A}, FocA_{H209I}, or FocA_{H209T} revealed these strains showed a similar reduction in growth rate to that observed for DH701 synthesizing FocA_{H209N} (Fig. 2c). Notably, DH701 synthesizing FocA_{H209T} showed the most severe growth reduction (almost 50% reduction in growth compared to DH701 synthesizing native FocA). Taken together, these results clearly indicate that when DH701 synthesizes FocA variants in which H209 is exchanged for an amino acid residue with either a small polar or non-polar side chain, essentially no expression of formate-dependent *fdhF_p::lacZ* occurs because of efficient formate efflux from the cytoplasm.

The side chains of alanine and isoleucine cannot form H-bonds, and this precludes an interaction with T91 (Fig. 1a). In contrast, the side chain of threonine is a potential hydrogen bond acceptor or donor. Therefore, to determine the impact that an amino acid residue with either a large (phenylalanine or tryptophan) or charged (lysine or aspartate) side chain has on formate translocation by FocA, the *focA* gene on plasmid *pfocA* was mutated at codon 209 to deliver the correspondingly altered *focA* genes (see online suppl. Table S2 supplementary data). The FocA variants constructed included FocA_{H209F}, FocA_{H209W}, FocA_{H209K}, and FocA_{H209D}, and their cognate plasmids (online suppl. Table S1) were introduced into strain DH701 (*focA*) and *fdhF_p::lacZ* expression after fermentative growth with glucose was determined (Fig. 2a). All four of these FocA variants had higher β -galactosidase enzyme activity compared to that of the *focA* mutant DH701, which indicates that these residue exchanges led to inactive, or poorly functional, FocA proteins in the efflux direction. Formate levels measured in the culture medium were similar to those determined for DH701 (Fig. 2b). Western blot analysis of selected examples of these variants demonstrated that they were stably inserted into the membrane of strain DH701 (online suppl. Fig. S1), thus obviating lack of synthesis as being the cause of the efflux-negative phenotype. Together, these results suggest that the exchange of H209 for a sterically larger aromatic amino acid residue, or for an amino acid residue with a charged side chain, impedes effective formate translocation across the cytoplasmic membrane.

Uptake of Exogenous Formate Is Dependent on H209 in the Pore of FocA

Next, we supplemented the anaerobic growth medium with 20-mM sodium formate and measured the effect on *fdhF_p::lacZ* expression [Beyer et al., 2013; Kammel et al.,

2021, 2022]. Strain DH701 lacking FocA showed only a minor increase in formate levels (change in β -galactosidase enzyme activity) of 30% upon exogenous formate supplementation, when compared with no formate addition (Fig. 2a). When strain DH701 synthesized the native FocA protein, encoded from plasmid *pfocA*, a 2-fold increase in intracellular formate level, compared to that of a strain producing no FocA, was measured (Fig. 2a); thus, any increase in *lacZ* expression above 30% was due to formate uptake via FocA. DH701 synthesizing either of the FocA_{H209A}, FocA_{H209I}, or FocA_{H209N} variants showed either no, or a minimal, formate uptake when exogenous formate was added to the culture (Fig. 2a). This reveals that these variants do not take up formate efficiently. Surprisingly, cells synthesizing the FocA_{H209T} variant showed an approximately 25-fold difference in intracellular formate level (reflected as increased β -galactosidase enzyme activity) between an experiment without added formate or with 20-mM formate added to the growth medium (Fig. 2a). This suggests that the FocA_{H209T} variant is at least partially able to permeate formate in the uptake direction. It should be noted, however, that the regulation pattern, i.e., formate level, in cells synthesizing this variant was similar to that of cells synthesizing native FocA, just overall significantly lower (~5-fold) (see Fig. 2a).

The F, W, and K variants all showed a similar 1.6- to 2-fold increase in activity (reflecting the intracellular formate level) compared to when no formate was added, while cells synthesizing the aspartate variant had an even higher formate level (~2.6-fold) (Fig. 2a). Generally, these H209 FocA variants (substitutions with either F, W, K, or D) showed comparable levels of intracellular formate like native FocA, when challenged with 20-mM exogenous formate (Fig. 2a). These data suggest that a capability for exogenous formate uptake was retained by five of the variants. We can exclude that this effect was exclusively due to passive diffusion of formic acid into the cells because, as mentioned above, the *focA* mutant DH701 failed to show a similar increase in *fdhF_p::lacZ* expression.

The Hypophosphite-Sensitivity Phenotype of Anaerobic E. coli Is Dependent on H209 in the Pore of FocA

The formate analogue sodium hypophosphite irreversibly inhibits PflB [Plaga et al., 1988], resulting in reduced anaerobic growth [Suppmann and Sawers, 1994; Kammel et al., 2022]. Hypophosphite enters the cell through FocA and *focA* mutants are insensitive to hypophosphite [Suppmann and Sawers, 1994]. The anaerobic

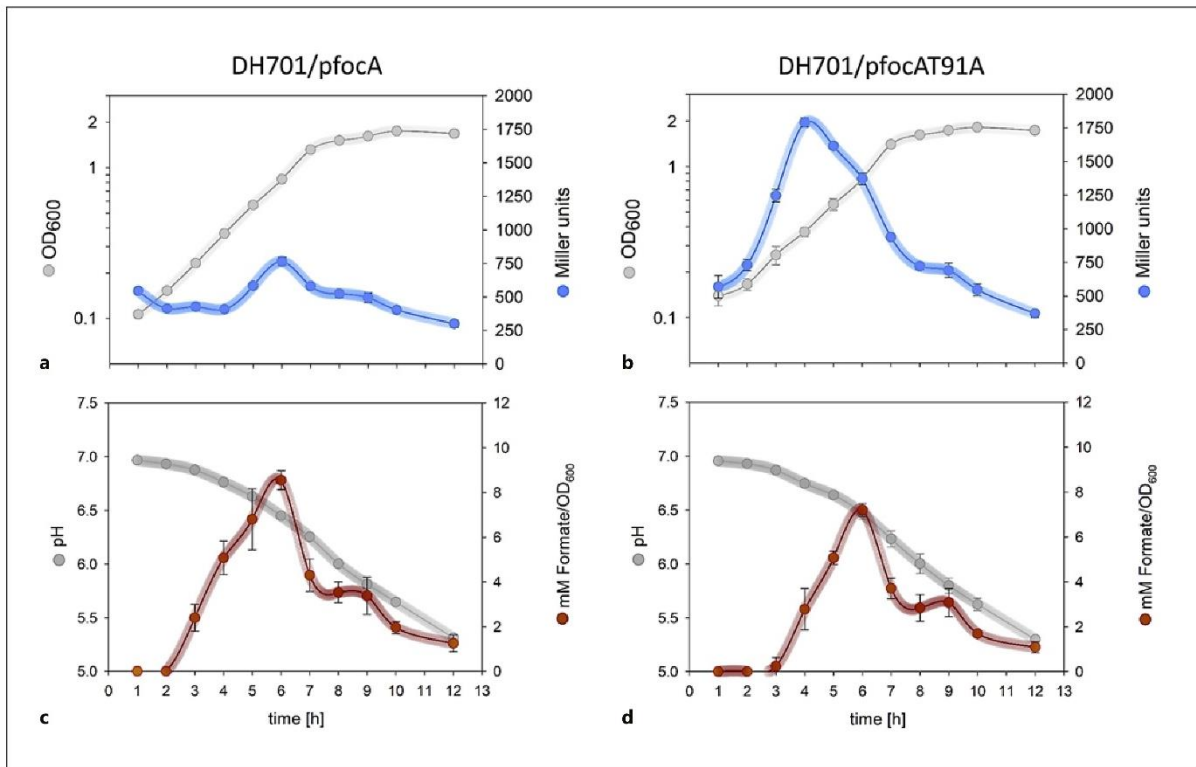


Fig. 3. Strains synthesizing FocA_{T91A} accumulate formate intracellularly. DH701/pfocA, a *focA* mutant synthesizing plasmid-encoded, native FocA (**a, c**), and DH701 (*focA*) synthesizing plasmid-encoded FocA_{T91A} (**b, d**) were grown anaerobically in glucose-M9 minimal medium. Samples of cells and culture medium were taken every hour to assess changes in *fdhF_p::lacZ* expression (blue curves), reflecting changes in intracellular formate levels, and the

extracellular formate concentration relative to optical density measured at 600 nm (red curves). The following parameters were determined: the optical density (OD₆₀₀) of the cultures and β-galactosidase enzyme activity (**a, b**), and pH and extracellular formate concentration (**c, d**). All experiments were performed with three biological replicates.

growth rate of DH701 synthesizing native FocA was reduced by approximately 50% when 0.5-mM hypophosphite was added to the growth medium (Fig. 2c; for percentage reduction of growth rates see online suppl. Table S3). In contrast, the growth rate of the *focA* mutant DH701 lacking any FocA was reduced by only 5% (Fig. 2c). The FocA_{H209A}, FocA_{H209I}, FocA_{H209T}, and FocA_{H209N} variants all showed only a minor reduction in growth rate of approximately 10%, indicating that hypophosphite uptake was severely impaired in DH701 synthesizing these variants (Fig. 2c). The H209F, W, K, and D variants of FocA showed minor reductions in growth rates in the presence of 0.5-mM hypophosphite, which ranged between 4% and 12%. This indicates that no, or only a lim-

ited amount of, hypophosphite was taken up by DH701 synthesizing these variants.

T91 Is Essential for Efficient Formate Efflux through FocA

Preliminary evidence has been presented showing that a T91A residue exchange impaired bi-directional formate translocation through FocA, suggesting that T91 has an important function in controlling formate translocation by FocA [Hunger et al., 2014]. To provide more detailed information as to how the T91A exchange affects formate translocation, a comparison of formate-dependent *fdhF_p::lacZ* expression by DH701 synthesizing native FocA and cells synthesizing FocA_{T91A} throughout anaer-

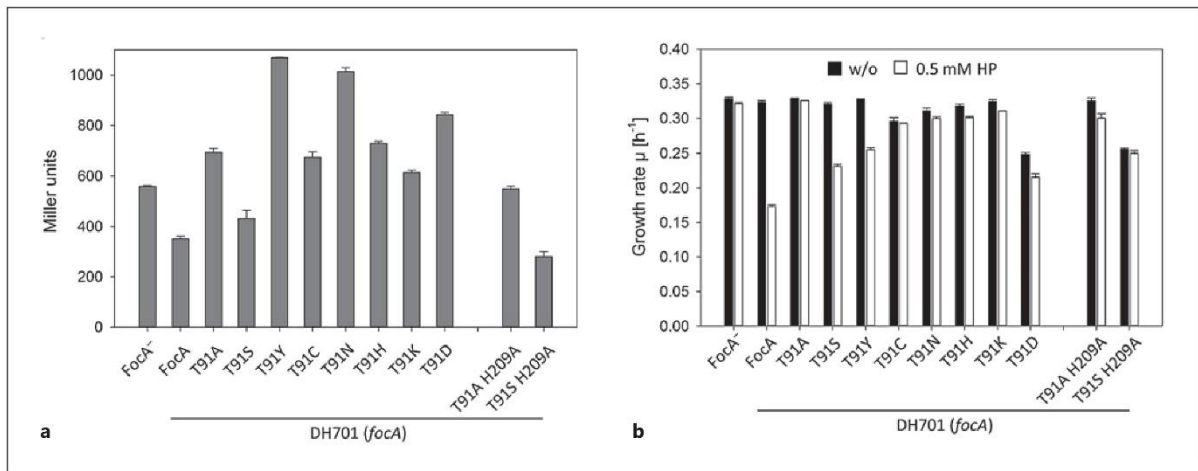


Fig. 4. Threonine or serine at residue position 91 is essential for formate-efflux by FocA. Parameters determined to monitor formate translocation were investigated in the *focA* mutant DH701 (*focA*) and in DH701 transformed with plasmids carrying a *focA* gene encoding the indicated T91 single, and T91-H209 double, amino acid-exchange variants. Strains were grown anaerobically in glucose-M9-minimal medium. **a** Analysis of the formate-induced β -galactosidase enzyme activity after growth of the indi-

cated strains to the late-exponential phase. **b** The sensitivity of the respective strains towards sodium hypophosphite was analysed by determination of anaerobic growth rates in the absence (black histogram) and in the presence of 0.5-mM sodium hypophosphite (white histogram). All experiments were performed with minimally three biological replicates, with each assay performed in duplicate.

obic growth in batch culture was done. It should be noted that the growth rates and final cell densities attained for DH701 synthesizing native FocA or FocA_{T91A}, along with their respective pH profiles, glucose consumption, and lactate formation levels, were all comparable (Fig. 3a–d, online suppl. Fig. S2a, b). The data revealed that the formate profiles (reflected as β -galactosidase enzyme activity) for cultures of DH701 synthesizing either native FocA or FocA_{T91A} were significantly different (Fig. 3a, b). High intracellular formate concentration was observed for DH701 synthesizing plasmid-encoded FocA_{T91A} during mid-exponential growth and peaked at a pH of 6.7 (Fig. 3b). In contrast, the peak formate level determined for DH701 synthesizing native FocA was 2.3-fold lower, correlated with a pH of 6.5 in the growth medium, and peaked during the late-exponential phase (Fig. 3a). The formate profile (enzyme activity) of DH701/FocA_{T91A} was more similar to that of the *focA* mutant DH701 [Kammel et al., 2022]. In both strains, the formate level decreased during stationary phase cultivation until only a low level was detectable in late-stationary phase cells (Fig. 3a, b); this was also observed previously for DH701 [Kammel et al., 2022]. The cells clearly take up either undissociated formic acid by passive diffusion across the cy-

toplasmic membrane, or via another unknown system, and this is ultimately disproportionated to hydrogen and CO₂ by the already induced formate hydrogenlyase complex [Rossmann et al., 1991; Kammel et al., 2022]. These data suggest that cells synthesizing the T91A variant of FocA accumulate formate intracellularly because they are unable to export formate effectively during the exponential phase growth (pH ~7).

After demonstrating that FocA_{T91A} is impaired in formate efflux, next, we determined the impact of introducing different amino acid exchanges at position 91 in FocA on intracellular formate levels. First, the consequences of exchanging T91 for a serine residue were tested (Fig. 4a). After anaerobic growth of DH701 transformed with plasmid pFocAT91S (encoding FocA_{T91S}), β -galactosidase enzyme activity was slightly higher than that measured for native FocA but significantly lower than that of DH701 (*focA*). This indicates that serine can replace threonine to allow maintenance of FocA's efflux function in strain DH701, even though it was less effective than native FocA. Exchange of T91 for tyrosine caused strain DH701 to accumulate formate in the cytoplasm, which was reflected by the increased β -galactosidase enzyme activity compared with the *focA* mutant, DH701 (Fig. 4a); the Y91

variant of FocA thus accumulated more formate intracellularly compared with the *focA* mutant. As FocA variants with a small polar residue and a hydroxyl group at position 91 proved to be functional in formate efflux, we next wanted to test whether the sulfhydryl-group of a cysteine residue was also able to deliver a functional FocA protein. The experiments with DH701 synthesizing FocA_{T91C} indicated formate efflux did not occur (Fig. 4a). Clearly, therefore, the hydroxyl function cannot be replaced by a sulfhydryl group.

A FocA_{T91N} variant was also constructed because a few examples of a T91N exchange are found in the sequence database (Fig. 1b). The FocA_{T91N} variant also proved unable to translocate formate efficiently out of the cytoplasm when synthesized in DH701 (Fig. 4a). Indeed, the formate level (reflected as increased β -galactosidase activity) was almost 2-fold higher compared with DH701 lacking FocA, indicating that formate accumulated intracellularly, as with the T91Y variant. Exchange of T91 for a different H-bonding residue, such as histidine, resulted in synthesis of a FocA variant that forced the strain to accumulate formate intracellularly (Fig. 4a). This FocA variant was apparently also unable to export formate. Finally, the substitution of T91 with charged amino acid residues like lysine and aspartate also resulted in efflux-defective variants of FocA and the FocA_{T91D} variant accumulated formate, albeit less than the level accumulated by the T91Y and N variants (Fig. 4a). In contrast, although the FocA_{T91K} variant was inactive in formate efflux, it did not result in significant intracellular accumulation of formate. These results underscore the importance of a residue with a small hydroxylated side chain at the tip of the Ω -loop in FocA. Note that all of these FocA variants were stably synthesized and inserted into the membrane of DH701, as exemplified for FocA_{T91A} and FocA_{T91H} (online suppl. Fig. S1).

Next, we compared the anaerobic hypophosphite-resistance phenotype of DH701 synthesizing these different T91-variants of FocA (Fig. 4b), which acts as a proxy for estimating effects on formate uptake [Kammel et al., 2022]. As described above, an approximate 50% reduction in anaerobic growth rate was noted when DH701 synthesized native FocA, while when the strain synthesized FocA_{T91S}, the growth rate was reduced by 28% in the presence of 0.5-mM hypophosphite (Fig. 4b). This result confirmed that although serine could replace threonine in effecting hypophosphite uptake, it was less efficient compared to threonine. Surprisingly, DH701/FocA_{T91Y} also exhibited partial sensitivity to hypophosphite, whereby a 22% reduction in growth rate due to the addition of

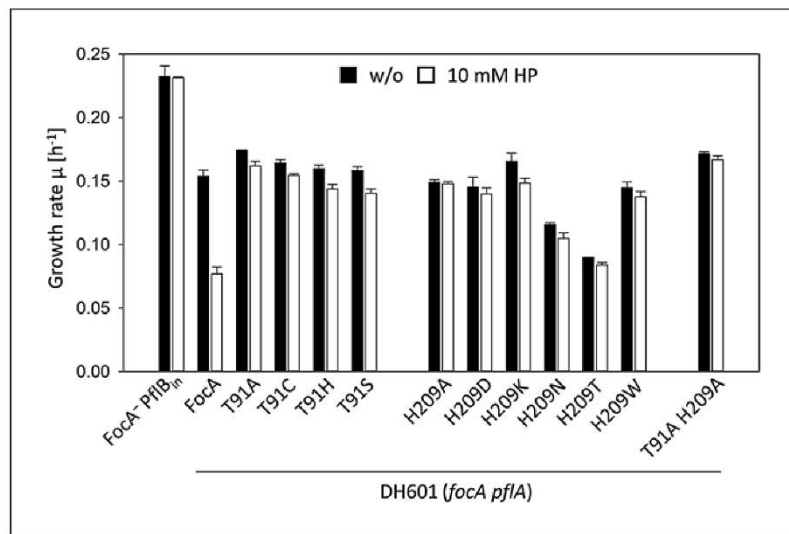
0.5-mM hypophosphite was measured. All of the other amino acid residue exchanges of T91 resulted in a growth-rate reduction in the presence of hypophosphite that was less than 14% (Fig. 4b; online suppl. Table S3). This indicates that hypophosphite uptake was severely impaired when the respective residue replaced T91. Together, these results strongly suggest that a hydroxyl group on the side chain of the residue located at the tip of the Ω -loop is required for FocA to function effectively in formate (and by inference hypophosphite) translocation; however, although the bulkier side chain of tyrosine was non-functional in the formate efflux direction, it was capable of at least partial hypophosphite uptake.

Hydrogen-Bond Formation between Histidine and Threonine Is Important for Formate Translocation

Examination of the meanwhile several hundreds of FNT amino acid sequences in the databases has failed to identify a variant with a serine residue replacing threonine at position 91 [Mukherjee et al., 2017]. This suggests a selective preference for threonine over serine at this position. To test the hypothesis that T91 has a crucial function in formate translocation by FocA, we constructed two variants of FocA, each with two residues exchanged. These variants included FocA_{T91A/H209A} and FocA_{T91S/H209A}. The cognate plasmids (see online suppl. Table S1) were freshly transformed into the *focA* mutant DH701 followed by anaerobic cultivation in M9-glucose minimal medium to mid-exponential growth phase. First of all, Western blot analysis was performed to determine whether the FocA derivatives were stably synthesized and inserted in the membrane of DH701 (online suppl. Fig. S1). Although synthesized in lower amounts compared to the synthesis of native FocA from *pfocA*, FocA_{T91S/H209A} was readily detectable in the membrane fraction of the strain. In contrast, FocA_{T91A/H209A} could only be detected after induction of expression of the cloned *focA* gene by the addition of anhydrotetracycline to the growth medium. This suggested that this FocA variant was made at a very low level in DH701.

Measurement of β -galactosidase enzyme activity for strains expressing the double mutants was then undertaken (Fig. 4a). The results revealed that enzyme activity for FocA_{T91S/H209A} was actually lower than for the *focA* mutant DH701 synthesizing native FocA. FocA_{T91A/H209A}, on the other hand, apparently did not excrete formate and displayed comparable β -galactosidase enzyme activity to DH701 (*focA*). The result indicates that when serine replaced T91, and when this was combined with an alanine replacement of H209, then the variant no longer

Fig. 5. Both threonine-91 and histidine-209 are essential for efficient translocation of hypophosphite by FocA. Sensitivity towards hypophosphite of strain DH601 ($\Delta pflA$, *focA*) synthesizing the indicated FocA variants was assessed by determining anaerobic growth rates in M9-glucose minimal medium in the absence (black histograms) or presence (white histograms) of 10-mM sodium hypophosphite. The analysis was performed with three biological replicates and repeated twice.



functioned as an exclusive formate efflux protein (compare results with FocA_{H209A} in Fig. 2a). Strain DH701 synthesizing FocA_{T91A/H209A} also failed to efflux formate effectively (Fig. 4a); however, we cannot exclude that this was because of restricted synthesis or stability of this FocA variant. Nevertheless, the result demonstrates that the T91S/A exchanges are dominant over H209A with respect to causing an efflux-negative phenotype and the data suggest that hydrogen-bond formation between histidine and threonine (or serine) is important for controlled formate translocation in the efflux direction.

Both of the FocA double-exchange variants, when synthesized in DH701, failed to show a hypophosphite-sensitive growth phenotype compared to native FocA (Fig. 4b). This indicates that these double-exchange variants were impaired in hypophosphite and, most likely, formate uptake.

T91 and H209 Are Essential for Efficient Hypophosphite Uptake by FocA

Introduction of a mutation in the *pflA* gene, encoding PflB activase, prevents activation of PflB and consequently results in no intracellular production of formate from this, or any other, formate-lyase reaction [Knappe and Sawers, 1990; Heßlinger et al., 1998]. Although active PflB is the principal target of the formate analogue hypophosphite [Suppmann and Sawers, 1994], even when PflB is inactive significantly increasing the concentration of exogenously added hypophosphite nevertheless impairs

growth further [Suppmann and Sawers, 1994]. This is possibly a consequence of hypophosphite inhibiting other glycol-radical enzymes, e.g., anaerobic ribonucleotide reductase. When strain DH601 (*focA*, $\Delta pflA$) was grown anaerobically in glucose-M9 medium supplemented with 10-mM sodium hypophosphite and compared to no hypophosphite addition, no difference in the growth rate was observed (Fig. 5; online suppl. Table S3) [Kammel et al., 2021]. In contrast, the same strain transformed with plasmid *pfocA* (encoding native FocA) showed an approximate 50% reduction in the anaerobic growth rate in the presence of 10-mM hypophosphite compared with no addition; note that even in the absence of added hypophosphite, overexpression of *focA* appears to reduce the anaerobic growth rate by approximately 30% (Fig. 5). Hypophosphite at 10-mM concentration thus severely reduces anaerobic growth, even when PflB is inactive, and hypophosphite causes this effect by entering the cell through FocA. As a consequence, this validates use of this assay system to analyse the effects of amino acid exchanges in the pore of FocA on the protein's ability to translocate hypophosphite in the complete absence of potentially competing intracellular formate.

Determination of the difference in growth rates in the presence versus absence of hypophosphite for DH601 synthesizing the different FocA variants revealed, firstly, that no variant functioned as effectively as native FocA (Fig. 5; online suppl. Table S3). The FocA_{H209A}, FocA_{H209D}, FocA_{H209W}, as well as the double exchange vari-

ant FocA_{T91A/H209A}, all caused a less than 5% reduction in growth rate (Fig. 5; online suppl. Table S3). The other variants, FocA_{T91A/C/H/S}, FocA_{H209K/N/T}, and FocA_{T91A H209A} all caused between a 5% and 10% impairment in the growth of strain DH601. Together, these results indicate that hypophosphite (and presumably by extension also formate) uptake is significantly impaired by any amino acid residue exchange of H209 or T91. Even the conservative exchange of T91 for a serine residue did not allow a significant retention of hypophosphite uptake and underscored the observation made using strain DH701 (*focA*) that, despite the hydroxyl group, the serine residue is less effective than a threonine residue at this position.

Discussion

The results presented in the current study underscore the importance not only of H209, but also of T91 for controlled permeation of formate *in vivo* through the FocA channel. Moreover, the importance of the hydroxyl group on the side chain of threonine at position 91 for channel function strongly suggests that the interaction between the threonine and histidine residues facilitates bi-directional anion passage through the pore. While it is possible to exchange H209 for a few select amino acid residues that still allow it to function, albeit only in the efflux direction, exchange of T91 for any other residue, except serine, impaired efflux of formate. Indeed, many exchanges caused intracellular accumulation of formate, as well as impaired uptake of both formate and its analogue hypophosphite. While tyrosine with its phenolic hydroxyl group functioned only poorly in the uptake direction, it was completely ineffective in the efflux direction. Thus, T91 is unequivocally important for efficient formate permeation in both directions.

Our recent results in which the histidine residue was exchanged for the non-protonatable residue asparagine resulted in exclusive formate efflux [Kammel et al., 2022]. While a few examples of FNT channels with an asparagine replacing histidine occur naturally, here, we exchanged H209 for several amino acid residues that do not occur naturally. Those with compact polar or non-polar side chains (alanine, isoleucine, and threonine) still permitted efficient formate efflux; however, like FocA_{H209N}, these variants were impaired in formate or hypophosphite uptake into cells. These findings further substantiate the recent proposal [Kammel et al., 2022] that a protonatable histidine within the pore is essential for formate permeation in the uptake direction. Of these three residues, only

threonine can be an H-bond acceptor or donor, which indicates that anion efflux can be achieved in variants without invoking H-bond formation, although a compact side chain structure is crucial.

When amino acid residues with sterically bulkier side chains, or residues with charged side chains, replaced histidine, then no, or severely impaired permeation of formate (including hypophosphite uptake) in either direction was observed. Together, these results suggest that bulky or charged residues impede the movement of the anion through the narrow constriction sites and hydrophobic core of the pores in the channel, and at the same time delimit the residues that still permit formate efflux [Kammel et al., 2022]. These effects are presumably due to electrostatic repulsion (e.g., aspartate), excessively strong electrostatic anion attraction (e.g., lysine), or steric blockage of the pore (e.g., with phenylalanine or tryptophan). Notably, because only N209 and Q209 variants of FNTs occur naturally, this suggests that the ability of the residue at position 209 on the S-loop to form a hydrogen bond with T91 is important for the correct functionality of FocA, as has been suggested on the basis of structural analyses [Lü et al., 2013; Waight et al., 2013; Hunger et al., 2014].

The threonine residue located at the tip of the Ω -loop in FocA (Fig. 1a) is conserved in all FNT proteins, except in those found in certain species of ascomycete fungi [Mukherjee et al., 2017; Kammel and Sawers, data not shown]. In those few cases, threonine is replaced by an asparagine. The FocA_{T91N} variant constructed and analysed in the current study was inactive in formate permeation and caused intracellular accumulation of the anion. This suggests that in these fungi other amino acid exchanges in the FNT might be necessary to allow anion permeation in the fungal system to occur.

No other amino acid residue, with the exception of serine, could replace threonine effectively at the tip of the Ω -loop in FocA. Despite the serine-exchange variant retaining at least a certain level of native formate efflux and uptake in strain DH701, this was not the case in strain DH601, which only has an inactive PflB and thus makes no intracellular formate. Moreover, when the S91 exchange was combined with an A209 exchange no hypophosphite uptake in strain DH701 (*focA*) was observed. This suggests that formate permeation through this variant is likely also impaired. An appropriately positioned hydroxyl group, aided by the methyl group on the side chain of threonine, at the tip of the Ω -loop that interacts with H209 in FocA is thus important for optimal translocation function. This is supported by the fact that the

structurally larger tyrosine could only replace threonine at this position poorly.

A detailed analysis of intracellular and extracellular formate profiles throughout the growth phase carried out with a FocA_{T91A} variant showed that cells synthesizing this protein accumulated formate intracellularly, especially in the early phases of growth (see Fig. 3b), indicating impaired efflux of formate. Nevertheless, formate was detected in the growth medium, which suggests that either a further system exists to export the anion or the high permeation coefficient of the undissociated formic acid ($pK_a = 3.75$) might allow some slow passive diffusion of the acid across the membrane when the internal concentration becomes excessively high. Furthermore, the finding that the FocA_{T91A} variant resulted in formate accumulation intracellularly suggests that native FocA has an important role in equilibrating formate across the membrane during the early stages of anaerobic growth. Replacement of the hydroxyl group of threonine with a thiol (cysteine) proved ineffective and the resulting FocA_{T91C} variant was severely impaired in bi-directional formate permeation. This implies that the ability of the hydroxyl group of threonine to form an H-bond with H209, and to coordinate with water [Lü et al., 2012], is important for formate permeation; the larger sulphur atom is only very weakly electronegative ($EN = 2.58$) compared with oxygen ($EN = 3.44$), and so coordinates water poorly.

The water molecule coordinated to T91 has been proposed to recover the proton from formic acid or nitrous acid during uptake of nitrite by NirC [Lü et al., 2012] because results of molecular dynamic studies indicate that a charged molecule cannot pass through the high energetic barrier imposed by the hydrophobicity of the pore [Lv et al., 2013; Atkovska and Hub, 2017]. However, the results presented here indicate that the T91-H₂O interaction is also likely to be important for formate translocation from the cytoplasm into the periplasm, possibly through helping polarize the hydroxyl group and thus aiding H-bond formation with the histidine's imidazole side chain. This would, in turn, imply that in native FocA, the H₂O-T91-H209 H-bond network has a key role in controlling bi-directional anion permeation. Although we cannot as yet propose a mechanism for this permeation, these data suggest that the previously proposed “closed”, i.e., the H-bonded conformation, identified in structural analyses might be the important conformation to allow controlled outward or inward anion permeation in vivo. Of course, the caveat to this proposal is that A209 and I209 variants of FocA, which cannot form an H-bond with T91, still allow formate permeation; however, only

in the efflux direction. It is conceivable, therefore, that the side chains of alanine and isoleucine are nevertheless sufficiently compact to allow anion passage across the cytoplasmic constriction site (see Fig. 1a). We also recently demonstrated that the soluble N-terminal domain of FocA is essential both for bi-directional formate permeation [Kammel et al., 2021] and for formate efflux by the FocA_{H209N} variant [Kammel et al., 2022]. Because PflB interacts with this domain [Doberenz et al., 2014], we propose that this interaction is required to ensure that the Ω -loop is appropriately positioned near H209 to allow regulation of formate efflux, and at low pH, formate uptake when H209 is protonated. Indeed, the structure of *E. coli* FocA was obtained with a protein lacking a complete N-terminal domain [Wang et al., 2009] and the structure revealed that T91 and H209 were separated by 5.7 Å and consequently not H-bonded (see Fig. 1a); nor was a coordinated water molecule resolved in the structure. Because removal of the N-terminal domain results in an inactive FocA channel [Kammel et al., 2021], this is in accord with our proposal that the interaction network is important for anion permeation. Future studies must now focus on the mechanism of formate permeation and whether, as has been proposed [Lü et al., 2012], a proton-relay within the H-bonding network recaptures the H⁺ suggested to be cotranslocated with formate in the uptake of the anion, or whether, as has also been alternatively proposed [Helmstetter et al., 2019], that formate: H⁺ symport drives anion uptake, without recapture of the H⁺.

Materials and Methods

Bacterial Strains, Plasmids, and General Cultivation Conditions

The strains, phage, and plasmids used in this study are listed in online supplementary Table S1. Growth of strains was done anaerobically in an M9 minimal medium [Sambrook et al., 1989], at 37°C, supplemented with 0.8% (wt/vol) glucose as a carbon source [Kammel et al., 2021]. For the investigation of extra- and intracellular formate in the exponential growth phase of DH601/DH701 strains transformed with plasmids carrying genes encoding different FocA variants, growth was done anaerobically in 15-mL Hungate tubes. When metabolic parameters were determined throughout the growth curve (sampled every hour) and the synthesis of various FocA variants was verified by Western blot analysis, cells were cultivated anaerobically in 250 or 500-mL serum bottles.

Where indicated, sodium formate was supplemented to a final concentration of 20 mM and sodium hypophosphite to a final concentration of 0.5 mM (for strain DH701), or 10 mM (for strain DH601) [Kammel et al., 2021, 2022]. When required, antibiotics were added to a final concentration of 50 µg/mL for kanamycin and 100 µg/mL for ampicillin.

Construction of Plasmids

Plasmid p*focA* carrying the native *focA* gene [Kammel et al., 2022] was used as the DNA template for the introduction of mutations in codons 91 and/or 209 of the gene. The oligonucleotides (IDT BVBA, Interleuvenlaan, Belgium) for site-directed mutagenesis are listed in online supplementary Table S2 (for methods, see [Kammel et al., 2022]). All introduced site-specific mutations were verified by DNA sequence analysis of the complete *focA* gene.

Hypophosphite-Sensitivity Test and β -Galactosidase Enzyme Activity Assay

The sensitivity of strains toward the formate analogue hypophosphite was tested by analysis of the growth rates in the exponential growth phase exactly as described [Kammel et al., 2021]. The growth analyses were performed in duplicate with biological triplicates and growth rates are presented with a standard deviation of the mean.

β -Galactosidase enzyme activity was measured and calculated as described [Miller, 1972] but performed with the modifications described [Kammel et al., 2021]. Unless otherwise indicated, all experiments were performed with at least biological triplicates when samples were taken throughout the growth curve. When experiments in which cultures for enzyme activity analysis were harvested in the mid-to-late-exponential phase of growth (OD ~ 0.7–0.9), the analysis was performed in duplicate. The β -galactosidase enzyme activities, presented in Miller units, are given with the standard deviation of the mean.

Analysis of Formate, Lactate, and Glucose Concentrations in the Culture Medium

The analysis of extracellular formic acid, lactic acid, and glucose levels in the culture medium was performed using HPLC exactly as described [Kammel et al., 2022]. The experiments were performed with minimally three biological replicates and data are presented with a standard deviation of the mean.

Verification of Synthesis and Membrane Integrity of FocA Variants

Preparation of membrane fractions for the identification of FocA variants was performed as described [Kammel et al., 2021, 2022]. Solubilized membrane fractions (50- μ g protein) were separated by gel electrophoresis using denaturing 12.5% (wt/vol) polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulphate [Laemmli, 1970]. Subsequently, Western blot analysis was carried out using anti-FocA antiserum (diluted 1:1,000) as described [Kammel et al., 2021, 2022].

References

- Atkovska K, Hub JS. Energetics and mechanism of anion permeation across formate-nitrite transporters. *Sci Rep.* 2017 Sep;7:12027.
- Beyer L, Doberenz C, Falke D, Hunger D, Suppmann B, Sawers RG. Coordinating FocA and pyruvate formate-lyase synthesis in *Escherichia coli*: preferential translocation of formate over other mixed-acid fermentation products. *J Bacteriol.* 2013 Apr;195:1428–35.
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 2004 Jun;14:1188–90.
- Doberenz C, Zorn M, Falke D, Nannemann D, Hunger D, Beyer L, et al. Pyruvate formate-lyase interacts directly with the formate channel FocA to regulate formate translocation. *J Mol Biol.* 2014 Jul;426:2827–39.

Computational Tools

To illustrate the locations of T91 and H209 within the FocA pore (PDB structure 3KCU [Wang et al., 2009]) a single protomer was visualized. The distance between the *pros*-N hydrogen on the imidazolium of histidine and the hydroxyl-group of the threonyl residue was determined using PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, version 2.5, Schrödinger, LLC). The degree of conservation of the amino acids from position 85 to 95 (*E. coli* FocA numbering) in the sequence alignment of 258 annotated FNTs was assessed and displayed using the WebLogo tool (online version 2.8.2) [Crooks et al., 2004].

Statement of Ethics

An ethics statement was not required for this study type, as no human or animal subjects or materials were used.

Conflict of Interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding Sources

This work received no specific grant from any funding agency and was supported financially by the Martin Luther University Halle-Saale through funding by the state of Saxony-Anhalt.

Author Contributions

Michelle Kammel and Oliver Trebbin carried out the experiments. Michelle Kammel and R. Gary Sawers designed the experiments and Michelle Kammel, Oliver Trebbin, and R. Gary Sawers analysed the data. Michelle Kammel and R. Gary Sawers drafted the manuscript and conceived the study. All authors read and approved the final manuscript.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

- Helmstetter F, Arnold P, Höger B, Petersen LM, Beitz E. Formate-nitrite transporters carrying nonprotonatable amide amino acids instead of a central histidine maintain pH-dependent transport. *J Biol Chem*. 2019 Jan;294:623–31.
- Hefßlinger C, Fairhurst SA, Sawers G. Novel keto acid formate-lyase and propionate kinase activities are components of an anaerobic pathway in *Escherichia coli* that degrades L-threonine to propionate. *Mol Microbiol*. 1998 Jan; 27:477–92.
- Hopper S, Böck A. Effector-mediated stimulation of ATPase activity by the sigma 54-dependent transcriptional activator FHLLA from *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1995 May;177:2798–803.
- Hunger D, Doberenz C, Sawers RG. Identification of key residues in the formate channel FocA that control import and export of formate. *Biol Chem*. 2014 Jul;395:813–25.
- Kammel M, Hunger D, Sawers RG. The soluble cytoplasmic N-terminal domain of the FocA channel gates bidirectional formate translocation. *Mol Microbiol*. 2021 Apr;115(4):758–73.
- Kammel M, Trebbin O, Pinske C, Sawers RG. A single amino acid exchange converts FocA into a unidirectional efflux channel for formate. *Microbiology*. 2022 Jan;168(1):001132.
- Knappe J, Sawers G. A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev*. 1990 Aug;6:383–98.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug;227:680–5.
- Lü W, Du J, Schwarzer NJ, Wacker T, Andrade SLA, Einsle O, et al. The formate/nitrite transporter family of anion channels. *Biol Chem*. 2013 Jun;394:715–27.
- Lü W, Du J, Wacker T, Gerbig-Smentek E, Andrade SLA, Einsle O, et al. pH-dependent gating in a FocA formate channel. *Science*. 2011 Apr;332:352–4.
- Lü W, Schwarzer NJ, Du J, Gerbig-Smentek E, Andrade SLA, Einsle O, et al. Structural and functional characterization of the nitrite channel NirC from *Salmonella* Typhimurium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Nov;109: 18395–400.
- Lv X, Liu H, Ke M, Gong H. Exploring the pH-dependent substrate transport mechanism of FocA using molecular dynamics simulation. *Biophys J*. 2013 Dec;105:2714–23.
- Miller JH. *Experiments in molecular genetics*. NY: Cold Spring Harbor; 1972.
- Mukherjee M, Vajpai M, Sankararamkrishnan R. Anion-selective formate/nitrite transporters: taxonomic distribution, phylogenetic analysis and subfamily-specific conservation pattern in prokaryotes. *BMC Genomics*. 2017 Jul;18:560.
- Plaga W, Frank R, Knappe J. Catalytic-site mapping of pyruvate formate lyase: hypophosphite reaction on the acetyl-enzyme intermediate affords carbon-phosphorus bond synthesis (1-hydroxyethylphosphonate). *Eur J Biochem*. 1988 Dec;178:445–50.
- Rossmann R, Sawers G, Böck A. Mechanism of regulation of the formate-hydrogenlyase pathway by oxygen, nitrate and pH: definition of the formate regulon. *Mol Microbiol*. 1991 Nov;5:2807–14.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor; 1989.
- Sargent F. The model [NiFe]-hydrogenases of *Escherichia coli*. *Adv Microb Physiol*. 2016 Mar;68:433–507.
- Sawers RG. Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans*. 2005 Feb;33:42–6.
- Sui H, Han BG, Lee JK, Walian P, Jap BK. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature*. 2001 Dec; 414:872–8.
- Suppmann B, Sawers G. 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*. 1994 Mar;11:965–82.
- Waight AB, Czyzewski BK, Wang DN. Ion selectivity and gating mechanisms of FNT channels. *Curr Opin Struct Biol*. 2013 Aug;23:499–506.
- Waight AB, Love J, Wang DN. Structure and mechanism of a pentameric formate channel. *Nat Struct Mol Biol*. 2010 Jan;17:31–7.
- Wang Y, Huang Y, Wang J, Cheng C, Huang W, Lu P, et al. Structure of the formate transporter FocA reveals a pentameric aquaporin-like channel. *Nature*. 2009 Nov;462:467–72.
- Wiechert M, Beitz E. Mechanism of formate-nitrite transporters by dielectric shift of substrate acidity. *EMBO J*. 2017 Apr;36:949–58.
- Wu B, Rambow J, Bock S, Holm-Bertelsen J, Wiechert M, Soares AB, et al. Identity of a *Plasmodium* lactate/H⁺ symporter structurally unrelated to human transporters. *Nat Commun*. 2015 Feb;6:6284.
- Zeng JM, Hapuarachchi SV, Shafik SH, Martin RE, Kirk K, van Dooren GG, et al. Identifying the major lactate transporter of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Sci Rep*. 2021 Mar;11(1): 6787.

3 Diskussion

In der Diskussion werden die zentralen Ergebnisse der in Kapitel 1 bis 3 vorgestellten Publikationen zusammengefasst, aber vielmehr soll aus den Erkenntnissen zur *EcFocA*-abhängigen Formiat-Permeation der getesteten Varianten ein Mechanismus, der die bidirektionale Formiat-Translokation beschreibt, und die Bedeutung bzw. Wechselwirkung des Proteins im Metabolismus abgeleitet werden.

3.1 FocAs besondere Funktion im Formiat-Regulon

Formiats Rolle als Effektormolekül im Metabolismus wurde bereits in Abschnitt 1.2 detaillierter beschrieben und zeigt eine Involvierung in die Synthese vieler Moleküle (DNA-Bausteine oder Aminosäuren) und auch in die Regulation der Expression vieler Komponenten des Formiat-Regulons, die in der Energiekonservierung von anaerob lebenden Organismen beteiligt sind. Eine Feinkontrolle der intra- und extrazellulären Formiat/Ameisensäure-Konzentration ist für die Mikroorganismen daher essentiell und es soll erläutert werden, wie der Formiat-Kanal FocA dazu vor allem auch durch die Interaktion mit weiteren Enzymen einen Beitrag leisten kann.

3.1.1 FocAs N-Terminus und die Wechselwirkung mit PfIB

Erste Hinweise auf den engen Zusammenhang zwischen FNTs und deren Anion-produzierenden oder abbauenden Enzymen ergaben molekularbiologische Untersuchungen, die eine Organisation der codierenden Gene in Operon-Strukturen nachwiesen (Peakman *et al.*, 1990; White und Ferry, 1992; Suppmann und Sawers, 1994). Wie schon beschrieben, wird der *E. coli* Formiat-Kanal FocA in dem bicistronischen *focA-pfl* Operon codiert, dessen komplexe transkriptionelle Regulation sicherstellt, dass FocA nur unter anaeroben Bedingungen synthetisiert wird (Sawers und Böck, 1989; Sawers und Suppmann, 1992; Suppmann und Sawers, 1994; Sawers und Watson, 1998). Aus phylogenetischen Untersuchungen geht jedoch hervor, dass sich die Co-Lokalisierung von *focA* und *pflB* ausschließlich auf Proteobakterien, Firmicutes und grüne Schwefelbakterien beschränkt. Innerhalb der Proteobakterien liegen *focA* und *pflB* in der Regel direkt benachbart, lediglich in wenigen Mikroorganismen wie *Bacillus coagulans* und *Halobacillus halophilis* werden die Transkriptionseinheiten durch Alkoholdehydrogenase-Gene unterbrochen (siehe Abb. A2 im Anhang, STRING Datenbank; Szklarczyk *et al.*, 2021). Diese genomische Assoziation impliziert eine mögliche Interaktion zwischen FocA und PfIB auf Protein-Ebene und diese geht vom N-Terminus von FocA aus (Doberenz *et al.* 2014).

Wie in 1.3.1 erläutert, ist dieser Proteinbereich zwischen den FNTs nicht konserviert (vgl. Abb. 6; Wang *et al.*, 2009) und allgemein leiten sich aus der Flexibilität und der hohen Variabilität zwei mögliche Funktionen des N-Terminus ab. Zum einen lässt sich eine Stabilisierung des Proteins in der Membran vermuten. Dies bestätigte die durchgeführte Western-Blot-Analyse in der die FocA Δ K2-P31-Variante (Deletion des kompletten N-terminalen, cytoplasmatischen Teils des Proteins) nur detektiert wurde, wenn das entsprechende Gen zusätzlich induziert wurde (vgl. Abb. S2, SI, Kammel *et al.*, 2021). Außerdem waren die erzielten Ausbeuten nach der Proteinreinigung für die FocA Δ K2-P31 bzw. FocA Δ K2-L10-Variante drei- bis sechsfach geringer als für das Wildtyp-Protein (Kammel *et al.*, 2021). Es wurde

geschlussfolgert, dass der *N*-Terminus von FocA auch wichtig für dessen Synthese ist und eine stabilisierende Funktion, möglicherweise zur Verankerung in der Membran, für das Protein hat. Eine generelle Destabilisierung, die sich negativ auf die Membranintegrität oder den oligomeren Zustand des Proteins auswirkte, konnte jedoch ausgeschlossen werden, da das Protein mittels Detergenz (*n*-Dodecyl- β -D-Maltosid, DDM) aus der Membran solubilisiert und auch durch *Blue Native* PAGE als Pentamer nachgewiesen werden konnte (Abb. 3 in Kammel *et al.*, 2021).

Zum anderen belegen die Daten aus Kapitel 1, dass der *N*-Terminus von FocA auch funktionelle Bedeutung in der Formiat-Translokation hat. Analysen des Formiat-Effluxes und des Formiat- bzw. Hypophosphit-Imports zeigten, dass der *N*-Terminus essentiell ist, da die FocA Δ K2-P31 und FocA Δ K2-L10-Varianten diesbezüglich inaktiv waren (Abb. S5 und Tab. S1 der *S/Is* in Kammel *et al.*, 2021, Abb. S2 und S3e der *S/Is* von Kammel *et al.*, 2022a). Insgesamt scheint es in dieser Proteindomäne ein Zusammenspiel aus der Struktur und einigen spezifischen Aminosäuren zu geben, welches beeinflusst, ob eine FocA-abhängige Formiat-Translokation stattfinden kann (Kammel *et al.*, 2021). Dies steht vermutlich in Verbindung mit der zweiten Funktion des FNT *N*-Terminus; die Wechselwirkung dieser Domäne von FNTs mit Interaktionspartnern.

Mittels verschiedener *in vitro* Methoden wurde die Interaktion von FocA und PflB bereits bestätigt. Zunächst wurden in einem *pull down assay* mit gereinigtem FocA im Zelllysate eines parentalen *E. coli* Stammes PflB als Interaktionspartner über Immunodetektion und LC/MS-MS Analyse (Flüssigkeitschromatographie mit nachfolgender Tandem-Massenspektrometrie-Analytik) nachgewiesen (Doberenz *et al.*, 2014). Zudem wurde auch die Interaktion mit dem PflB-homologen Enzym TdcE beobachtet (Falke *et al.*, 2016). Weiterhin wurden auch PflA (das PflB-aktivierende Enzym), Alkoholdehydrogenase und Glutamatdecarboxylase im Komplex mit FocA detektiert (Zorn, 2014). Weiterführende Vernetzungs-Analysen mit verschiedenen Vernetzungsgenzien identifizierten die Aminosäure-Seitenketten, welche im FocA-PflB-Komplex verbunden waren (siehe Tabelle A3, Abb. A6 und A7, Ergebnisse der Arbeitsgruppe von A. Sinz, MLU Halle). Insgesamt fällt bei der Auswertung der *in vitro* Vernetzungsanalysen auf, dass sich die meisten Aminosäurereste von FocA, welche mit PflB interagierten, im *N*-terminalen Bereich des Proteins befinden (Ausnahme K112, S187, K191 und E240), wohingegen die Seitenketten großflächig an der Oberfläche von PflB verteilt sind (graphische Darstellung in Abb. A6 im Anhang). Es war daher auf Grundlage dieser Ergebnisse nicht einfach ein Modell des FocA-PflB-Komplexes, unter der Berücksichtigung aller Vernetzungsergebnisse und welches sinnvolle Restriktionen der von den Vernetzungsgenzien vorgegebenen $\text{C}\alpha$ - $\text{C}\alpha$ Distanz einhält, zu erstellen. Zusätzlich ist es wichtig zu beachten, dass PflB *in vivo* als Dimer und FocA als Pentamer vorkommt. Interessant wäre es daher auch *in vivo* Vernetzungsstudien durchzuführen, um zu klären, wie das PflB-Dimer mit dem FocA *N*-Terminus interagiert und ob jeweils nur ein PflB-Monomer, möglicherweise das katalytische Aktive, in der Interaktion beteiligt ist. Dafür sollten Vernetzungsgenzien mit guter Membranpermeabilität verwendet und Verbindungen mit unterschiedlichem Abstandhalter getestet werden. Diese könnten dann direkt bei der anaeroben Kultivierung zugegeben werden und je nach funktioneller Gruppe die Aminosäure-Seitenketten von FocA mit PflB vernetzen.

Obwohl die vorgestellten *in vitro* Vernetzungs-Experimente eine gewisse Limitierung haben, liefern sie wichtige Hinweise, welche Aminosäuren nicht nur an der *in vivo* Interaktion mit PflB beteiligt sind,

sondern auch relevant für die Translokationsaktivität von FocA sind. So wurde die Interaktion mit PflB *via* D4 in FocA in Verbindung mit der funktionellen Bedeutung des identifizierten D4-N5-P6-Motives gebracht (Abb. 4 und S5 der *SIs* von Kammel *et al.*, 2021). Weiterhin konnten die im zweiten Teil der α -Helix identifizierten Aminosäuren der Vernetzungsanalysen (Y25, K26 und K29) auch als bedeutsam für die FocA-abhängige Formiat-Translokation bestätigt werden (Motiv bestehend aus Y25-K26-(A27)-T28-K29; unveröffentlichte Daten M. Kammel und G. Sawers, vgl. Abb. A8 im Anhang).

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der im Rahmen der in Kapitel 1 vorgestellten Publikation erkennbar wird, ist der Einfluss von PflB; das heißt dessen Vorhandensein in der aktiven oder inaktiven Form bzw. dessen Fehlen. Unabhängig vom Zustand des PflBs (bzw. dessen Aktivität) waren die Tendenzen des Einflusses der Alanin-Substitutionen bzw. der N-terminalen Verkürzungen auf den Formiat-Influx in den meisten Fällen sehr ähnlich (vgl. Abb. 6 und S5 in den *SI* aus Kammel *et al.*, 2021). Insgesamt lässt sich ableiten, dass die Formiat-Aufnahme (und der Hypophosphit-Import, vgl. Abb. S4 und *SI* aus Kammel *et al.*, 2021) stark vom Vorhandensein von PflB, jedoch weniger von seinem aktiven Zustand, abhängig ist. Eine Aussage, inwieweit der Zustand von PflB auch den Efflux von Formiat beeinflusst, ist schwierig zu treffen, da nur aktives PflB die Formiat-Produktion katalysiert. Da für die meisten Varianten die β -Galaktosidase-Aktivität nur an einem Punkt der Wachstumskurve detektiert wurde (exponentielle Phase), ist es oft schwierig Efflux bzw. Import-Prozesse voneinander abzugrenzen. Dafür wären zeitaufgelösten Studien besser geeignet.

Es stellt sich die Frage, wie genau PflB die Formiat-Permeation durch die Wechselwirkung mit FocA beeinflusst. Strukturbiologen wie D. N. Wang postulierten, dass PflB in seiner aktiven Form mit dem N-Terminus von FocA interagiert und diesen so verschieben könnte, dass die Translokationspore zugänglich ist (Waight *et al.*, 2013). Zudem könnte die Interaktion eine Konformationsänderung initiieren, durch welche sich die Ω -Schleife in den cytoplasmatischen Vorraum der Pore verschiebt, sodass das produzierte Formiat in den Kanal einströmen kann.

3.1.2 Methoden zur *in vitro* und *in vivo* Charakterisierung der FNT-Translokationsaktivität

Da größere Diskrepanzen zwischen den Daten aus *in vitro* Analysen der FNT-abhängigen Translokation verschiedener Ionen im Vergleich zu den bereits publizierten und im Rahmen dieser Dissertation erhobenen *in vivo* Daten vorliegen, erfolgt an dieser Stelle ein Einschub zur Methodik. Dafür sollen die elektrophysiologischen Methoden, welche zur Charakterisierung der Kanal- bzw. Transportproteine genutzt wurden, zunächst kurz vorgestellt werden und ihre Aussagekraft in Hinblick auf den *in vivo* Translokationsmechanismus beurteilt werden.

Bei der Analyse von Ionen-Kanälen, welche in der Regel hohe Transportraten aufweisen, wird vor allem die *Patch-Clamp*-Technik verwendet (Hodgkin *et al.*, 1952). Bei der *Voltage-Clamp*-Methode können bei konstanter Spannung Ionenströme direkt mit rekonstituierten Proteinen, welche in planaren Lipiddoppelschichten integriert vorliegen, bestimmt werden. Auf diesen Methoden basierten auch die Analysen zur Selektivität von *StFocA*, *StNirC* und *CdHSC* (Lü *et al.*, 2012a und b; Czyzewski und Wang, 2012).

Wie schon in Abschnitt 1.3 beschrieben, ist die Klassifizierung der FNTs als Kanal- bzw. Transporter nicht geklärt, was die Auswahl zweckdienlicher analytischer Techniken erschwert. Obwohl elektrophysiologische Methoden sehr gut geeignet sind, um die Translokation in Bezug auf kinetische und mechanistische Details zu charakterisieren, sind Aussagen zur Stöchiometrie nur begrenzt ableitbar. Daher ist eine Kombination verschiedener Methoden, wie die Markierung der zu translozierenden Ionen notwendig. Die Arbeitsgruppe von E. Beitz untersuchte die Spezifität der FNTs beispielweise mit ^{14}C -radioaktiv markierten Substraten (Wiechert *et al.*, 2017). Auch spektroskopische Methoden wie Infrarot-Spektroskopie und verschiedene Raman-Techniken ermöglichte durch Verwendung eines Isotopes bzw. radioaktiv markierten Substanzen eine Differenzierung von zu translozierenden Molekülen (Metcalf *et al.*, 2022).

Experimentelle Untersuchungen der Membranproteine setzen generell voraus, dass diese in speziellen Systemen wie Membranvesikeln, Proteoliposomen oder anderen Lipidsysteme (u.a. *solid-supported membranes*) integriert werden, da es sonst nicht möglich ist einen elektrochemischen Gradienten, entlang dessen der Transport erfolgt, zu generieren. Der Einsatz solcher Systeme mit verschiedenen Kompartimenten kommt zellulären Systemen zumindest teilweise nahe, auch wenn mögliche wechselwirkende Komponenten des zellulären Metabolismus keine Berücksichtigung finden. Dies ist oft auch der Fall, wenn die FNTs in heterologen Systemen analysiert werden. In der Arbeitsgruppe um E. Beitz wurden in den Translokationsanalysen die Gene der FNTs aus den Organismen *Plasmodium falciparum* und *Babesia bovis* im Hefesystem überexprimiert (Wiechert und Beitz, 2017; Wiechert *et al.*, 2017). Unter der Annahme, dass FNTs mit weiteren Organismen-spezifischen Interaktionspartnern wechselwirken und die Translokation möglicherweise dadurch reguliert wird, können die Erkenntnisse der *in vitro* Analysen nicht einfach auf Mechanismen der *in vivo* Ionen-Translokation übertragen werden.

Die hier verwendeten *in vivo* Methoden sind daher besser geeignet die Komplexität des Metabolismus abzubilden. Generell kann der experimentelle Aufbau, welcher in den in Kapiteln 1 bis 3 vorgestellten Publikationen ausführlicher diskutiert wurde, als geeignet eingeschätzt werden, da im Zusammenspiel der β -Galaktosidase-Aktivitätsversuche, der Wachstumsinhibierung durch Formiat-Analoga und der chromatographischen Methoden (HPLC-Analytik für die organischen Säuren im Kulturüberstand und GC zur Messung der H_2 -Produktion) Aussagen zur *in vivo* Translokationsaktivität von FocA abgeleitet werden können (siehe Abschnitt 1.4). Die Analyse im Zellsystem hat jedoch den entscheidenden Nachteil, dass sich viele proteinspezifische Aktivitäten wie der Formiat-Abbau durch den FHL-1-Komplex überlagern. Um die Formiat-Translokation mechanistisch detaillierter aufzulösen, sollten daher weitere Methoden, beispielsweise die Analyse des Protonenflusses genutzt werden und eine vollständige Kohlenstoffbilanz aufgestellt werden. An entsprechender Stelle werden auch die Limitierungen des Methodenspektrums der Dissertation genannt und weitere Methoden zur Adressierung der ungelösten Fragestellungen vorgeschlagen.

3.1.3 Spezifität der FNTs zu ihren translozierenden Ionen

Im Abschnitt 3.1.1 wurde auf Grundlage der experimentellen Daten aus Kapitel 1 hauptsächlich die Interaktion von FocA und PfIB diskutiert. Es ergeben sich jedoch weitere Fragestellungen: Gibt es für die anderen FNTs auch cyto- bzw. periplasmatische Interaktionspartner? Wie wird die Selektivität der FNTs für die translozierenden Ionen vermittelt? Diese Aspekte werden nachfolgend erörtert.

Sehr häufig ist die Spezifität von Anionen-translozierenden Membranproteinen geringer als die für Kationen, da letztere durch den Transport von H^+ -, Na^+ -, K^+ - oder Ca^{2+} -Ionen oft in elementare und regulatorische Signalprozesse involviert sind (Latorre und Miller, 1983). Die Polyspezifität von Anionen-Kanälen lässt sich zum einen durch die allgemeine Funktion Ladung auszugleichen erklären und zum anderen auch damit, dass Anionen mitunter sehr diffuse Elektronenwolken aufweisen, wohingegen die Ladung bei Kationen eher punktförmig verteilt ist (Eisenman und Horn, 1983; Rychkov *et al.*, 1998). Auch wenn mittels elektrophysiologischer Methoden nachgewiesen wurde, dass die Spezifität der FNTs zu ihren namensgebenden Ionen am höchsten ist, so wurde für auf monovalente Anionen eine Polyspezifität festgestellt (Lü *et al.*, 2012a und b; Czyzewski und Wang, 2012; Waight *et al.*, 2013; Wiechert und Beitz, 2017). Für StNirC wurde bevorzugte Nitrit-Translokation, aber auch ca. 70 % Permeabilität für Formiat-Ionen gezeigt (Lü *et al.*, 2012b). Dies wurde ähnlich für StFocA, bei welchem die Spezifität für Nitrit 30 % reduziert gegenüber Formiat war, bestätigt (Lü *et al.*, 2012a). Darüber hinaus wurde für StFocA die Translokation weiterer Produkte der gemischten Säuregärung wie Lactat und Acetat beobachtet (Lü *et al.*, 2012a). Czyzewski und Wang zeigten 2012, dass CdHSC aus neben Hydrosulfid auch Nitrit und Formiat, aber kein Sulfid (SO_3^{2-}) transloziert.

In vivo Studien wiesen jedoch für FocA nach, dass dieser Kanal ausschließlich Formiat/Ameisensäure transloziert (Suppmann und Sawers, 1994; Beyer *et al.*, 2013; Doberenz *et al.*, 2014). Unabhängig davon ob im Stammhintergrund der Formiat-Kanal FocA synthetisiert wurde, änderte sich das zeitaufgelöste Konzentrationsprofil von extrazellulärem Lactat, Pyruvat, Acetat und Succinat nicht. Dies konnte auch mit den in der Dissertation etablierten Versuchsbedingungen bestätigt werden (vgl. Abb. 3 a, b, e und f; und Abb. S3 a und b der SI in Kammel *et al.*, 2022a). Selbst wenn die FNTs nicht komplett spezifisch für ihre Ionen sind, spielt dies *in vivo* vermeintlich maximal eine untergeordnete Rolle, da in den Organismen, in denen sie vorkommen, nur die Translokation der jeweils namensgebenden Ionen entscheidend für den Metabolismus bzw. die Energiekonservierung ist.

Vergleicht man die in den verschiedenen FNTs translozierten Ionen, so gibt es zum einen Unterschiede im Molekülradius. Daher weisen eukaryotische FNTs, welche vermutlich Acetat oder Lactat transportieren, in der Regel im Durchmesser vergrößerte Konstriktionen im Vergleich zu FocA auf (Wiechert *et al.*, 2017). Zum anderen unterscheiden sich die translozierten Ionen der FNTs auch durch ihre Säurestärke. Nitrit (pK_a-Wert = 3,4) ist eine stärkere Lewis-Säure als Formiat und hat außerdem ein freies Elektronenpaar am Stickstoff. Hydrosulfid hingegen weist einen pK_a von ca. 7 auf und liegt unter physiologischen Bedingungen im Vergleich zu Formiat, zu einem wesentlich größeren Anteil als Säure, also protoniert vor. Insgesamt bedeutet dies, dass sich die Energiebarrieren beim Transport der Ionen bzw. korrespondierenden Säure unterscheiden und der Anspruch an die wechselwirkenden Aminosäuren in der unmittelbaren Nähe der Translokationspore verschieden sind.

Dennoch ist die strukturelle Ähnlichkeit aller FNTs in Hinblick auf die Architektur der Translokationspore, das heißt in Bezug auf die Konstriktionen und die Aminosäuren, welche die Pore bilden, sehr hoch (Wang *et al.*, 2009, Waight *et al.*, 2010, Czyzewski und Wang, 2012; Lü *et al.*, 2012b; vgl. Abb. A3 im Anhang und Abschnitt 3.2.3). Die größten Abweichungen der Primärstrukturen gibt es im Bereich des *N*-Terminus und nicht innerhalb der Pore oder der Selektivitätsfilter, dem Bereich in der Nähe der cytoplasmatischen bzw. periplasmatischen Konstriktionen. Es scheint daher schlüssig, dass der *N*-Terminus nicht nur eine allgemeine Translokations-vermittelnde, als *gating* bezeichnete Funktion hat, sondern auch zur Spezifität der FNTs für ihre jeweiligen Ionen beiträgt.

Ähnlich wie für die Interaktion von PflB mit dem *N*-Terminus von FocA beschrieben (3.1.1), könnten auch die Wechselwirkungen zwischen HSC und der Sulfitreduktase (AsrABC in *C. difficile*) bzw. NirC und Nitritreduktase (NirBD in *E. coli*) sowohl regulatorische Funktion erfüllen und für erhöhte Spezifität sorgen. Für einen weiteren Vertreter der FNTs, dem Formiat-aufnehmenden Kanal FdhC aus *M. formicicum*, wurde hingegen eine Interaktion mit der membrangebundenen Formiatdehydrogenase postuliert (White und Ferry, 1992). Ob auch in diesem System eine spezifische Interaktion der Proteine stattfinden kann, wie eine mögliche Regulation der Formiat-Imports aussieht und eine Involvierung des *N*-Terminus von FdhC diesbezüglich, ist nicht geklärt. Generell kann man sich vorstellen, dass es im Fall von FdhC weitere cytoplasmatische Interaktionspartner gibt bzw. dies auch für die anderen FNTs bezüglich periplasmatischer Interaktionspartner gilt.

3.1.4 FocA und die Wechselwirkung mit dem FHL-1-Komplex

Neben der Interaktion von FocA mit dem Formiat produzierenden Enzym PflB ist das Zusammenspiel mit dem Formiat-Hydrogenlyase-Komplex (FHL-1) bedeutsam. In *E. coli* übernimmt FHL-1, dessen Formiatdehydrogenase (FDH-H) und Hydrogenase (Hyd-3) als Redoxkomplex zusammenarbeiten, unter fermentativen Bedingungen die Hauptfunktion in der reversiblen Umwandlung von Formiat und Protonen zu CO₂ und H₂ (Böhm *et al.*, 1990; Pinske und Sawers, 2016). Die Aufgabe von FocA im Zusammenhang mit dem FHL-1-Komplex ist es, die intrazelluläre Akkumulation von organischen Säuren wie Ameisensäure gering zu halten, sodass der cytoplasmatische pH von *E. coli* zwischen 7,4 und 7,8 konstant bleibt (Slonczewski *et al.*, 1981, Rossmann *et al.*, 1991; Kammel und Sawers, 2022a).

Doch wie genau gewährleisten FocA und FHL-1 eine gute Kopplung, sodass Formiat bei der Wiederaufnahme in die Zelle effizient umgesetzt werden kann? Zum direkten Zusammenspiel oder einer Interaktion beider Proteine ist nicht viel bekannt. In Proteinreinigungsstudien von F. Sargent (Newcastle Universität, Großbritannien) wurden der FHL-1-Komplex und FocA co-gereinigt (unpublizierte Daten, persönliche Information von G. Sawers). Dies impliziert eine direkte Protein-Protein-Interaktion.

In einer sehr aktuellen Studie wurden der Export von (PflB-abhängig) produziertem Formiat und die Aufnahme und exogen supplementiertem ¹³C-markiertem bzw. deuteriertem Formiat analysiert (Metcalfe *et al.*, 2022). Die Autoren der Studie zeigten, dass unter fermentativen Bedingungen verschiedene Transportmodi für den Influx von intrazellulär produziertem und supplementiertem Formiat existierten, wobei letzteres mit nahezu 10-fach höherer Rate aufgenommen wurde. Außerdem konnten

Metcalf *et al.* (2022) belegen, dass der Influx des exogenen (deuterierten) Formiats direkt an die Disproportionierung durch FHL-1 geknüpft war (Geschwindigkeit von $111 \pm 12 \mu\text{mol Formiat OD}^{-1} \text{ min}^{-1}$), aber parallel dazu der Efflux von intrazellulärem Formiat stattfand (maximale Rate von $34 \pm 3 \mu\text{mol Formiat OD}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Die sehr hohe Aufnahme rate des markierten Formiats wurde interpretiert als direkte Verbindung von Formiat-Influx und FHL-1-Aktivität. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass der Formiat-Influx auch direkt durch den FHL-1-Komplex erfolgen könnte. Dies könnte auch erklären, warum unter gewissen Bedingungen die FHL-abhängige H_2 -Produktion einer *focA focB*-Doppelmutante auf gleichem Niveau wie beim Parentalstamm war (Hakobyan *et al.*, 2018). Dass es alternative Formiat-aufnehmende Systeme gibt, deuten viele Studien an und darauf soll im Abschnitt 3.1.5. nochmal detaillierter eingegangen werden.

Generell scheint die funktionale und strukturelle Assoziation von FocA und FHL-1 sinnvoll, da so Formiat bzw. die Protonen, welche im möglichen Symport *via* FocA aus dem Periplasma aufgenommen werden, direkt an FHL-1 weitergeleitet werden könnten. Die Cryo-EM-Struktur des *Ec*FHL-1-Komplexes konnte in der Antiporter-ähnlichen Untereinheit HycC eine potentielle Translokationspore für den Protonen-Transport identifizieren, welche eine effiziente Kopplung des Formiat/ H^+ -Imports und der Formiat-Disproportionierung möglich machen würde (Andrews *et al.*, 1997; Steinhilper *et al.*, 2022). So könnte auch die hohe Michaelis-Menten-Konstante (K_m) von FDH-H zu Formiat von 26 mM (*in vitro* Daten) kompensiert werden, da die Synthese des FHL-Komplexes selbst in deutlich niedrigeren Formiat-Konzentrationen (geringer millimolarer Bereich) induziert wird (Axley *et al.*, 1990; Hopper und Böck, 1995). Auch wenn es spekulativ ist und es dafür keine experimentellen Daten gibt, wäre es vorstellbar, dass es eine Art PflB-FocA-FHL-Superkomplex gibt, welcher für die kontrollierte Formiat-Produktion, den Transport und direkt parallel dazu für dessen Umsatz sorgt.

Desweiteren stellt sich die Frage, ob es unter anderen Stoffwechselbedingungen, Alternativen zu FHL-1 bzw. der funktionellen Einheit aus PflB, FocA und FHL-1, gibt. Steht unter fermentativen Bedingungen weniger Glukose als Kohlenstoffquelle zur Verfügung, dann wurde beobachtet, dass FHL-1 nicht den größten Anteil an der H_2 -Produktion in *E. coli* hat, sondern dies auf die Aktivität vom FHL-2-Komplex oder auch Hydrogenase-2 zurückgeführt werden konnte (Andrews *et al.*, 1997; Mnatsakanyan *et al.*, 2014; Trchounian und Trchounian, 2014). Dies könnte bedeuten, dass unter Stressbedingungen bzw. bei Glukosemangel die Aktivitäten einiger Schlüsselenzyme wie FHL-1 und auch PflB im anaeroben Formiat-Stoffwechsel möglicherweise durch FHL-2 sowie TdcE übernommen und damit ausgeglichen werden können. Da *focB* auch zum *hyf*-Operon gehört und die Expression ähnlich reguliert sein könnte, ist denkbar, dass unter den zuletzt beschriebenen Bedingungen FocB eine größere Rolle in der Formiat-Translokation einnehmen könnte (Andrews *et al.*, 1997). Diese alternativen Proteine zur Verfügung zu haben, wäre eine sinnvolle Strategie für anaerob lebende Mikroorganismen, um unter verschiedensten Bedingungen eine pH- und Formiat-Homöostase zu gewährleisten (Trchounian *et al.*, 2012). Es gibt sogar einige Enterobakterien wie *Pectobacterium atrosepticum* und *Trabulsilla guamensis*, welche ausschließlich FHL-2-ähnliche Komplexe aufweisen (Finney *et al.*, 2019; Lindenstrauß und Pinske, 2019).

3.1.5 Modell des Zusammenspiels aller Komponenten des anaeroben Formiat-Stoffwechsels

Alle bisher erläuterten Wechselwirkungen und die weiteren Komponenten des Formiat-Regulons sind in Abbildung 12 zusammengefasst. Dieses hypothetische Modell der Proteine, welche in den anaeroben *E. coli* Formiat-Stoffwechsel involviert sind, enthält auch FHL-2 und weitere potentielle Formiat-Kanäle.

Wie schon erklärt, belegen die *in vivo* Translokationsdaten, dass es alternative Formiat-translozierenden Proteine gibt, da Formiat bzw. Ameisensäure die Membran nicht einfach durch Diffusion überwinden kann und auch in der *focA*-Mutante (REK701 bzw. DH701) Formiat-Efflux und Influx beobachtet wurde (Suppmann und Sawers, 1994 und Abb. A4 im Anhang). Die Fragestellung, welche Kanäle bzw. Transporter diese Translokation bewerkstelligen, wurde in der Doktorarbeit von L. Beyer (MLU Halle) adressiert. Dabei konnte ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um NirC handelt, da für eine *focA*- und eine *focA-nirC*-Doppelmutante ähnliche Formiat-Translokation nachgewiesen wurde (Suppmann, 1993 und Beyer, 2014). Eine schwache Formiat-Importaktivität wurde auch für den Succinat-Transporter DauA gezeigt (Babu *et al.*, 2010; Karinou *et al.*, 2013; Beyer, 2014). Darüber hinaus wurde aufgrund der Annotation als Formiat-Kanal und der Sequenzähnlichkeit zu FocA FocB als potentieller Kandidat bestätigt, was Experimente, bei denen in einer *focB*-Mutante verringerter Formiat-Import festgestellt wurde, unterstützten (Andrews *et al.*, 1997, Beyer, 2014). Da die Formiat-Aufnahme durch cAMP gesteigert wurde und die cAMP-Konzentration in Regel in Abwesenheit von Glukose höher ist, kann vermutet werden, dass *focB* unter Stressbedingungen exprimiert wird (Rossmann *et al.*, 1991; unveröffentlichte Daten L. Beyer und G. Sawers). Diese Regulation entspricht einer klassischen Katabolit-Repression (Wanner *et al.*, 1978). Obwohl weitere Tests zur Identifizierung anderer Formiat-translozierender Proteine nicht erfolgreich waren (Studien AG Sawers; Methodik wie in Suppmann und Sawers, 1994), ist nicht auszuschließen, dass es dafür weitere Kandidaten gibt.

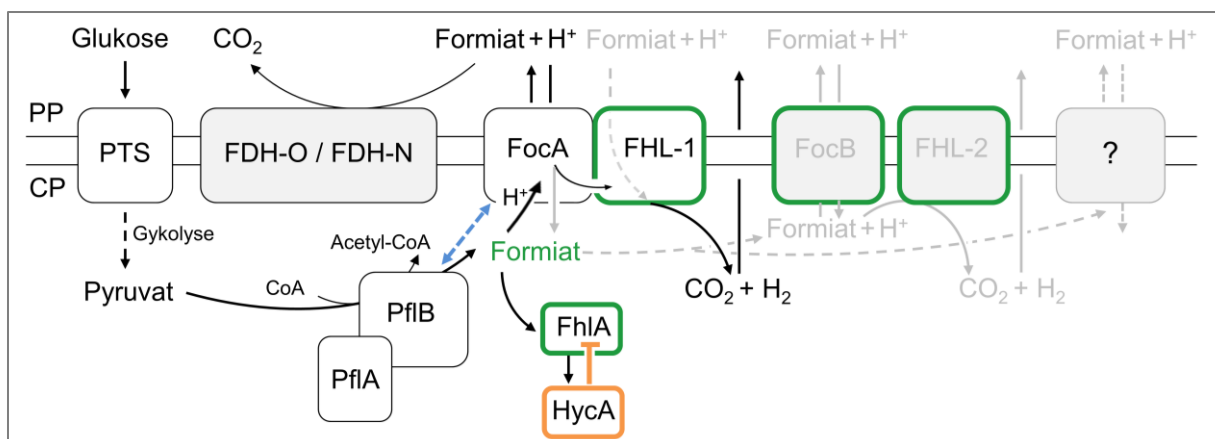


Abbildung 12: Modell der Wechselwirkung der Proteine des anaeroben *E. coli* Formiat-Metabolismus.

Schematische Darstellung der Proteine des anaeroben Formiat-Stoffwechsels. Komponenten, deren Expression Formiat bzw. FhlA-abhängig reguliert wird, sind in Grün hervorgehoben. Der Gegenspieler von FhlA ist in Orange hervorgehoben. Der blaue Pfeil deutet eine Protein-Protein-Wechselwirkung an. Grau hinterlegt sind Proteine, welche unter „Standard“-Gärungsbedingungen mit Glukose vermutlich keine bedeutende Rolle spielen, das heißt nur geringe oder keine Aktivität aufweisen. Folgende Abkürzungen wurden verwendet; PTS: Phosphotransferase-System, FocA: Formiat-Kanal A, FocB: Formiat-Kanal B, PflB: Pyruvat Formiat-Lyase; PflA: PflB-aktivierendes Enzym, FDH-O/-N :Formiatdehydrogenase-O bzw. -N, FHL: Formiat-Hydrogenlyase-Komplex (1 und 2), FhlA: Formiat-Hydrogenlyase Aktivator, HycA: FHL regulierendes Protein, CP: Cytoplasma und PP: Periplasma.

3.2 Die Bedeutung von konservierten Aminosäuren in der Translokationspore von *E. coli* FocA

Wie in Abschnitt 1.3.2 beschrieben, gibt es in den FNTs eine Vielzahl von konservierten Aminosäuren. Eine Übersicht der Häufigkeit des Vorkommens dieser und die Lokalisierung im *E. coli* FocA-Protomer ist in Abbildung A3 im Anhang gezeigt.

3.2.1 Die Funktion des zentralen Histidins (H209)

In der Konservierungsanalyse in Abb. A3a zeigt sich, dass die Aminosäure Histidin (in *EcFocA* H209) nahezu unveränderlich in allen FNTs ist (98,7 % Konservierung in mehr als 2200 FNT-Sequenzen; Mukherjee *et al.*, 2017). Die polare Imidazolium-Funktion von Histidin befindet sich direkt im zentralen Teil der hydrophoben Translokationspore (vgl. Abb. 8 und A3b). Histidin ist die einzige proteinogene Aminosäure, welche unter physiologischen Bedingungen sowohl deprotoniert, als auch protoniert vorliegen kann. Der pK_a -Wert des „freien“ Imidazoliums ist ca. 6, kann aber je nach der Proteinumgebung und welche Interaktionen zu benachbarten Aminosäuren möglich sind auch zwischen 3 und 9 liegen (Zhou *et al.*, 1993; Plesniak *et al.*, 1996). Die starke Konservierung, die Position und chemischen Eigenschaften von H209 stehen auch direkt im Zusammenhang damit, dass eine wichtige Funktion als „pH-Sensor“ für den Translokationsmechanismus der FNTs postuliert wurde (Lü *et al.*, 2011 und 2012b; Feng *et al.*, 2012). Der pK_a der Imidazolium-Gruppe des Histidins wird durch die hydrophobe Umgebung und durch Helixdipol-Effekte im FNT-Protein zusätzlich verringert und in Übereinstimmung mit *in silico* Daten, wird Histidin die Protonierung der zu translozierenden Ionen zugeschrieben (Feng *et al.*, 2012; Lü *et al.*, 2012b; Atkovska und Hub, 2017). Diese Thesen widersprechen dem von E. Beitz aufgestellten Modell zum Translokationsmechanismus (vgl. Abschnitt 1.3.3), welches besagt, dass die Protonierung der zu translozierenden Ionen außerhalb des zentralen Abschnitts der Translokationspore, und damit unabhängig von Histidin, stattfindet (Helmstetter *et al.*, 2019).

Umfangreichere *in vivo* Translokationsstudien mit einer Vielzahl von FocA_{H209}-Varianten, welche im Kapitel 2 und 3 vorgestellt wurden, sollten daher die Anforderung an die Aminosäure an Position 209 untersuchen, um daraus Aussagen zum Translokationsmechanismus ableiten zu können. Die Ergebnisse diesbezüglich sind in Tabelle 2 zusammengefasst (Daten aus Kammel *et al.*, 2022a und b). Insgesamt kann aus den Analysen, in welchen der Einfluss sämtlicher Aminosäure-Eigenschaften abdeckt wurde, abgeleitet werden, dass keine der untersuchten FocA-Histidin-Varianten ein dem Parentalstamm ähnliches bidirektionales Translokationsverhalten zeigten.

Wurde H209 durch Aminosäuren mit saurer (D und E), basischer (K und R), hydrophober und sterisch anspruchsvoller (W und F) bzw. polarer und größer (Y) Seitenkette substituiert, dann akkumulierte Formiat intrazellulär, der Influx von Formiat war hingegen nicht bzw. nur wenig beeinflusst (Abb. 2a und c in Kammel *et al.*, 2022b). Diese Ergebnisse der Translokationsaktivität von FocA_{H209Y} bestätigten zumindest teilweise die Beobachtung von Hunger *et al.* aus 2014 (vgl. Abschnitt 1.4). Unterschiede der FocA_{H209Y}-Variante im Formiat-Import in den Stämmen DH601 und DH201 sind darauf zurückzuführen, dass im Stamm DH201 kein PflB synthetisiert wird. Die Ergebnisse in Kammel *et al.*, 2022b basierten auf Experimenten in welchen PflB in der aktiven bzw. inaktiven Form (DH601) vorlag. Außerdem zeigte

sich, dass sterisch anspruchsvolle Aminosäuren und solche mit geladenen Seitenketten, unabhängig davon ob sie potentielle Akzeptoren oder Donoren für Wasserstoffbrücken sind, den Formiat-Efflux behinderten. Ob FocA_{H209D/E/K/R/W/Y}-Varianten bezüglich der Formiat-Aufnahme wirklich aktiv waren, wie es die β -Galaktosidase-Aktivitäten implizierten (Abb. 2a in Kammel *et al.*, 2022b), oder Formiat durch alternative Systeme aufgenommen wurde und dessen Efflux in den FocA-Varianten im Vergleich zur *focA*-Mutante stärker unterbunden wurde, konnte leider nicht hinreichend differenziert werden. Mögliche Gründe für die defizitäre Formiat-Translokation sind elektrostatische Abstoßung durch die Carboxyl-Gruppe (D und E), wohingegen die positiv geladenen Seitenketten (R oder K) die Ionen zu stark anziehen und durch die Länge der Seitenketten die Translokationspore verengen könnten (F und W).

Tabelle 2: Translokationsaktivitäten verschiedener T91 und H209 FocA-Varianten.

Die Translokationsaktivitäten der aufgeführten FocA-Varianten wurden im Stammhintergrund DH701 (MC4100 *focA* λ *fdhFp::lacZ*) durchgeführt. Die Zellen wurden wie beschrieben anaerob bis zur exponentiellen Wachstumsphase in M9 Minimalmedium mit 0,8 % (w/v) Glukose (und im Fall der Analyse des Imports mit zusätzlich 20 mM Natriumformiat im Kulturmedium) kultiviert und anschließend auf ihre β -Galaktosidase-Aktivität untersucht (Kammel *et al.*, 2021 und 2022a). Zur Analyse der Hypophosphit-Aufnahme wurden die Wachstumsraten in An- und Abwesenheit von 0,5 mM Natriumhypophosphit bestimmt (Kammel *et al.*, 2022a). Eine Reduktion der Wachstumsrate zeigte, dass bei den jeweiligen Varianten, die Hypophosphit-Aufnahme stattfand. Sowohl die Farbe, als auch die Symbolik zeigen an, ob das untersuchte Molekül von den entsprechenden Varianten transloziert wurde. Grün und +++/++ zeigen hohe Transportaktivität, Orange und + einen intermediären Phänotyp (deutlich reduzierte Aktivität zum Wildtyp) und Rot und – implizieren, dass die Varianten inaktiv waren. Wenn Daten nicht erhoben wurden, wird dies mit n.d. angezeigt. Als Referenzen der Daten dienten folgende Publikationen [1] Kammel *et al.*, 2021, [2] Kammel *et al.*, 2022a und [3] Kammel *et al.*, 2022b. Ergebnisse die auch im Rahmen dieser Dissertation erhoben wurden, aber unpubliziert sind, wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Variante	Formiat-Efflux		Import von			
			Formiat		Hypophosphit	
Wildtyp	++	[1]	++	[2]	++	[1]
H209A/I	+++	[3]	-	[3]	-	[3]
H209D/E*	-	[3]	++	[3]	-	[3]
H209F/W	-	[3]	++	[3]	-	[3]
H209K/R*	-	[3]	++	[3]	-	[3]
H209N/Q	+++	[2]	-	[2]	-	[2]
H209T	+++	[3]	-	[3]	-	[3]
H209Y	-	[3]	+	[3]	-	[3]
T91A	-	[3]	++	[3]	-	[3]
T91C	-	[3]	++	[*]	-	[3]
T91D	-	[3]	n.d.		-	[3]
T91H	-	[3]	++	[*]	-	[3]
T91K/R*	-	[3]	n. d.		-	[3]
T91N	-	[3]	n. d.		-	[3]
T91S	+	[3]	+	[*]	+	[3]
T91Y	-	[3]	n. d.		+	[3]

Die Substitution von H209 durch kleine, hydrophobe Aminosäuren (A und I), eine polare Aminosäure mit Hydroxyl-Funktion (T) oder Amid-Gruppe (N und Q) limitierte die FocA-Translokationsaktivität ausschließlich auf den Formiat-Efflux (Kammel *et al.*, 2022a und b). Dass zuletzt genannten Varianten einen defizitären Formiat-Influx aufwiesen, konnte aus der zeitaufgelösten Analyse der intra- und extrazellulären Formiat-Konzentration von DH701/*pfocA*-H209N im Vergleich zu DH701/*pfocA* und aus Versuchen, bei welchen eine zusätzliche Supplementierung des Kulturmediums mit 20 mM Natriumformiat erfolgte, abgeleitet werden (siehe Abb. 2b und Abb. 3a, c, e und g, Kammel *et al.*, 2022a). An dieser Stelle sollte nochmal darauf hingewiesen werden, dass die Nachweisgrenze der intrazellulären Formiat-Konzentration im β -Galaktosidase assay bei ca. 5 mM liegt (Hopper und Böck, 1995). Das bedeutet, dass nicht ausgeschlossen werden kann, ob der Import von Formiat *via* FocA_{H209N/Q} erfolgte, dieses aber sofort wieder exportiert wurde. Dies steht auch im Zusammenhang damit, dass keine H₂-Produktion beobachtet wurde, da keine Formiat- und FhIA-abhängige Synthese des FHL-1-Komplexes stattfand (vgl. Abb. 2d, Kammel *et al.*, 2022a).

Bei FocA_{H209A/I/N/Q/T} wurde neben der Inaktivität bezüglich des Imports ein deutlich reduziertes Wachstum der damit komplementierte Zellen beobachtet (Abb. 2c, Kammel *et al.*, 2022b). Dieser Wachstums-Phänotyp wurde genauer analysiert, indem anaerobe Wachstumsraten und die OD₆₀₀ nach 20 h in verschiedenen Kulturmedien, M9-Minimalmedium mit und ohne Casaminosäuren und Vollmedium, bestimmt wurden (siehe Tabelle A2 im Anhang). Unabhängig vom Kulturmedium konnte für DH4200 (enthält die chromosomale Substitution des *focA*-Codons 209, sodass FocA_{H209N} synthetisiert wird; Kammel *et al.*, 2022a) im Vergleich zu Parentalstamm (DH4100) und *focA*-Mutante (DH701) keine Reduktion der Wachstumsrate beobachtet werden (unveröffentlichte Daten von M. Kammel und G. Sawers). Es ist daher davon auszugehen, dass das Wachstum bis zur exponentiellen Wachstumsphase nahezu unbeeinflusst war und erst in der spät-exponentiellen Phase, in welcher der Formiat-Import erfolgen würde, gestört war, sodass die Zelldichte nicht weiter anstieg. Dies könnte damit begründet sein, dass der nahezu unkontrollierte Formiat-Efflux einen Kohlenstoffverlust bewirkte. Im Vergleich zur *focA*-Mutante, bei welcher Formiat möglicherweise durch alternative Formiat-Aufnahmesysteme in die Zelle gelangt und FHL-1-abhängig abgebaut werden kann, ist der „Druck“ in DH4200 höher, dass Formiat/Ameisensäure außerhalb der Zelle bleibt. Dieses Kohlenstoffdefizit konnte jedoch weder durch die Verwendung von Vollmedium, den Casaminosäure-Zusatz im Minimalmedium, oder zusätzliche Supplementierung mit Desoxyribonukleotiden, da Formiat bei deren Synthese essentiell ist, ausgeglichen werden (Daten von M. Kammel und G. Sawers nicht gezeigt). Man kann daher davon ausgehen, dass neben dem Kohlenstoffverlust auch die disruptierte pH-Homöostase in DH4200 für das reduzierte Wachstum verantwortlich ist.

Die einzigen natürlich vorkommenden Aminosäuren, welche Histidin an dieser Position ersetzen, sind Asparagin (*E. histolytica*) und Glutamin (*B. thuringiensis* und *Clostridium tetani*). In diesen Organismen kann der „*efflux-only*“-Phänotyp der FocA-Varianten auch physiologisch erklärt werden. Das vermutlich als Efflux-Kanal funktionierende FNT-Protein aus *E. histolytica*, welcher Energie über Acetat-Ethanol-Gärung konserviert, sorgt dafür, dass Acetat effizient aus dem Organismus geschleust wird (Loftus *et al.*, 2005). Von der Gruppe um E. Beitz durchgeführte Studien, welche die Formiat-Translokation von *E. histolytica* FNT in Proteoliposomen mit überwiegender „*outside-in*“-Orientierung, das heißt in Efflux-

Richtung bestimmten, konnte bestätigt werden, dass eine nicht-protonierbare Aminosäure mit Amid-Funktion anstelle von Histidin, die Formiat-Permeation nicht beeinflusst (Helmstetter *et al.*, 2019). Weiterhin wurde von den Autoren die pH-Abhängigkeit dieser Translokation untersucht und festgestellt, dass deren Rate mit sinkendem pH zunahm. Daher wurde geschlossen, dass die Protonierung der zu translozierenden Ionen in FNTs Histidin-unabhängig ist und der Transport generell vom Protonengradient getrieben sein könnte. Die Daten dieser Studie von Helmstetter *et al.*, 2019 sollten durch das artifizielle Analyse-System und da keine Untersuchungen der Translokation in Import-Richtung durchgeführt wurden, kritisch beurteilt werden.

Im Vergleich der Formiat-Efflux- und Influxaktivitäten der FocA_{H209}-Varianten, aber auch aus den Daten des Kapitels 1 wird deutlich, dass sich die Translokationsmechanismen je nach Direktionalität unterscheiden. Nachfolgend soll dies auch in Zusammenhang mit den erhobenen Hypophosphit-Daten gebracht werden. Generell sind die Hypophosphit-Analysen sehr bedeutsam, da auch das Formiat-Analogon FocA-abhängig aufgenommen wird (Suppmann und Sawers, 1994). Hypophosphit ist eine starke Säure mit einem pK_a von 1 und liegt daher nahezu ausschließlich in der dissoziierten Form vor. Da Hypophosphit von keiner der *EcFocA* Histidin-Austauschvarianten aufgenommen wurde, konnte so die funktionelle Bedeutung eines Protonierungsschrittes durch H209 im Aufnahme-Mechanismus bestätigt werden (Kammel *et al.*, 2022b).

3.2.2 Mechanistische Bedeutung von T91 und die Interaktion mit H209

Auch das sich in räumlicher Nähe zum zentralen Histidin befindende Threonin (in *EcFocA* T91) gehört zu den am stärksten konservierten Aminosäuren in FNTs (97,8 % Konservierung in mehr als 2200 FNT-Sequenzen; Mukherjee *et al.*, 2017). Daher wurde auch eine Relevanz für den Translokationsmechanismus im sogenannten Modell des Protonen-Zyklisierens von der Gruppe um O. Einsle postuliert (vgl. Abschnitt 1.3.3; Lü *et al.*, 2012b). Threonin ist auf der flexiblen Ω -Schleife von FocA lokalisiert und je nach Position dieser, kann es in einem Abstand $< 3 \text{ \AA}$ durch die Hydroxyl-Gruppe mit N_{ε2} der Imidazolium-Seitenkette des zentralen Histidins *via* Wasserstoffbrückenbindung wechselwirken (Waight *et al.*, 2010). Waight *et al.*, 2010 stellten daher die These auf, dass das Threonin mit Formiat-Ionen um die Wasserstoffbrücken-Interaktion mit Histidin konkurriert und die Translokation so auch direkt über die Konzentration der Anionen reguliert wird. Diese auf *in vitro* Untersuchungen und Strukturdaten von *VcFocA* basierenden Aussagen wurden auch mit dem Hydrosulfid-Kanal *CdHSC* überprüft (Czyzewski und Wang, 2012). In *in vitro* Transport Analysen von *CdHSC* in Proteoliposomen zeigten sich, dass ein T84A-Austausch (entspricht T91 in *EcFocA* bzw. T90 *VcFocA*) in stark reduzierter Formiat-Aufnahme der Variante resultierte, was jedoch nicht auf strukturelle Änderungen zurückgeführt wurde (Czyzewski und Wang, 2012). Denn unabhängig vom pH (PDB: 3TDP pH 4,5; 3TDR pH 7,5; 3TDO pH 9; jeweils Abstand von T84-OH zu H201-N_{ε2} $\sim 3 \text{ \AA}$) und von der T84-Substitution (PDB: 3TE1, Abstand von A84-CH₃ zu H201-N_{ε2} $\sim 4,5 \text{ \AA}$), lag *CdHSC* in der gleichen Konformation vor (Czyzewski und Wang, 2012). Inwieweit generell aus den strukturellen Daten allgemeingültige Aussagen zur Translokationsfähigkeit abgeleitet werden können, soll an anderer Stelle (3.3.2) diskutiert werden.

Dass eine Threonin-Substitution eine reduzierten Formiat-Translokation hervorrief, bestätigte auch die *in vivo* Untersuchungen von D. Hunger von 2014. Darüber hinaus konnte für eine *focA*-Mutante, welche eine chromosomale Substitution des *focA*-Codons 91 aufweist, sodass $\text{FocA}_{\text{T91A}}$ synthetisiert wird (DH4300; Kammel und Sawers, 2022a), gezeigt werden, dass diese defizitär in der Formiat- und pH-Homöostase war (Kammel und Sawers, 2022a). Dies lässt sich mit einer pH-abhängigen Formiat-Akkumulation erklären; denn im Vergleich zum Parentalstamm (DH4100) oder einer *focA*-Mutante (DH701; keine Synthese von FocA), konnte für DH4300 bei niedrigen pH-Werten des Kulturmediums eine deutlich gesteigerte intrazelluläre Formiat-Konzentration nachgewiesen werden, was bestätigte, dass T91 für die pH-abhängige Formiat-Translokation essentiell ist (Kammel und Sawers, 2022a).

Im Kapitel 3 der vorliegenden Dissertation wurde dann genauer analysiert, was die Determinanten für die Aminosäure an Position 91 bezüglich der FocA-abhängigen Formiat-Translokation in *E. coli* sind. Die Analyse der intrazellulären Formiat-Konzentration in mit FocA_{T91} -Varianten komplementierten DH701-Zellen ergab, dass mit Ausnahme der Substitution durch Serin, kein weiterer Austausch toleriert wurde, bzw. in signifikantem Formiat-Efflux resultierte (vgl. Tabelle 2; Abb. 4a in Kammel *et al.*, 2022b). Der intermediäre Formiat-Efflux-Phänotyp von $\text{FocA}_{\text{T91S}}$ verifizierte die Ergebnisse von D. Hunger, was mit der strukturellen Ähnlichkeit der Aminosäuren begründet werden kann (Hunger *et al.*, 2014). Die Methyl-Gruppe der Seitenkette von T91 hat neben dem sterischen Effekt, der sich auf die Zugänglichkeit zur Translokationspore auswirkt, einen geringen positiven induktiven Effekt. Dieser erhöht die Elektronendichte der Hydroxyl-Funktion und ermöglicht im Vergleich zu Serin eine stärkere Wasserstoffbrückenbindung (Sinnot, 1997). Dass die Hydroxyl-Gruppe der Aminosäure an Position 91 mechanistisch essentiell ist und nur so eine starke Wasserstoffbrückenbindung ausgebildet werden kann, unterstreichen auch die Translokations-Analysen mit $\text{FocA}_{\text{T91C}}$. In Bezug auf den Formiat-Efflux wurde für diese Variante keine Aktivität gemessen, was damit erklärt werden kann, dass die Sulfhydryl-Gruppe (C) nur in eine vergleichsweise schwache Wasserstoffbrücke involviert sein könnte. Dies ist mit dem signifikant größeren Atomradius und der geringeren Elektronegativität von Schwefel im Vergleich zu Sauerstoff zu begründen. Die Wichtigkeit der Hydroxyl-Funktion (von T, S oder Y) konnte auch bei der Untersuchung der Aufnahme von Hypophosphit bestätigt werden, denn für alle anderen T91-Varianten konnte keine Sensitivität gegenüber dem Formiat-Analogen beobachtet werden (Abb. 4b in Kammel *et al.*, 2022b). Ähnlich wie auch bei den $\text{FocA}_{\text{H209}}$ -Varianten wurde in Formiat-Influx-Analysen von FocA_{T91} -Varianten im Vergleich zur *focA*-Mutante eine erhöhte intrazelluläre Formiat-Konzentration bestimmt (vgl. Tabelle 2). Wie schon im vorherigem Abschnitt (3.2.1) erklärt, spricht das nicht eindeutig dafür, dass diese Varianten „aktiv“ Formiat aufnehmen, sondern es ist möglich, dass das Defizit im Efflux den dominierenden Effekt hat.

Die einzige natürlich vorkommende Substitution des Threonins ist Asparagin, welches in einigen Ascomyceten zu finden ist. In *Candida californica* oder *Kluyveromyces lactis* findet man aber neben T91N noch weitere Substitutionen wie E208T sowie N213D (Nummerierung bezogen auf die *E. coli* FocA-Sequenz), sodass die Transportaktivität dieser FNT-Varianten schlecht einzuschätzen ist.

Um die Bedeutung der Wasserstoffbrückenbindung besser aufzuschlüsseln, wurden zudem verschiedene *pfocA*-T91-H209-Doppelvarianten erstellt. Auffällig bei der Analyse von $\text{FocA}_{\text{T91S H209A}}$ war, dass ein ähnlicher Formiat-Efflux wie bei nativem FocA beobachtet wurde und somit nicht der durch

die H209A-Substitution hervorgerufene starke Efflux-Phänotyp dominant war (vgl. Abb. 4a in Kammel *et al.*, 2022b). Ähnlich wie bei FocA_{H209A} wurde keine Hypophosphit-Aufnahme verzeichnet (vgl. Abb. 4b in Kammel *et al.*, 2022b). Außerdem wurde die FocA_{T91H H209T}-Variante, in welcher das Potenzial zur Ausbildung der Wasserstoffbrücke erhalten bleibt, aber die Eigenschaften und Wechselwirkungen zu umgebenen Aminosäuren der zentralen Pore verändert wurde, untersucht. Die FocA_{T91H H209T}-Variante wies einen stärkeren Formiat-Efflux als der Parentalstamm auf, war aber nicht in der Lage Hypophosphit ins Cytoplasma zu importieren (unveröffentlichte Ergebnisse O. Trebbin, M. Kammel, und G. Sawers). Somit zeigt sich, dass nicht nur das Potential der Wasserstoffbrückenbildung, sondern generell die Architektur der Pore bzw. die Gesamtheit der Aminosäure-Wechselwirkungen die FocA-abhängige bidirektionale Formiat-Translokation bestimmt.

3.2.3 Weitere konservierte Aminosäuren und deren potentielle Funktion

In den FNTs gibt es vor allem im Bereich der transmembranen Helices, als auch der Ω und S-Schleife viele, stark konservierte Aminosäuren (vgl. Abbildung A3a im Anhang). In einer Sequenzanalyse von 2206 FNTs aller drei Domänen wird deutlich, dass fast ein Drittel der transmembranen Aminosäurereste eine hohe Konservierung aufweist (Mukherjee *et al.*, 2017).

So sind F75, L89, N121, A171, V175 und N262 noch stärker als die bereits genannten mechanistisch relevanten Aminosäuren (T91 und H209) konserviert (> 99 % Konservierung; Mukherjee *et al.*, 2017). Die Seitenketten dieser Aminosäuren befinden sich alle in der räumlichen Nähe der zentralen Translokationspore (A171, N262 sind in Interaktionsdistanz mit T91 und H209), der cytoplasmatischen (L89, N121, V175) und der periplasmatischen Konstriktion (F75) (vgl. Abb. A3b). Die Bedeutung der Aminosäuren, welche die cyto- und periplasmatischen Engstellen der Translokationspore bilden (L79, L89 bzw. F75 und F202), wurde im heterologen Hefe-System untersucht und es wurde festgestellt, dass *EcFocA* Mehrfach-Alanin-Substitutionsvarianten (L79A, L89A, F75A und F202A) verringerte Formiat-Translokation, aber erhöhte Protonen und Wasser-Permeabilität, zeigten (Schmidt und Beitz, 2021). Auch mit homologen Systemen konnte die Dysregulation der Formiat-Translokation dieser *EcFocA*-Austauschvarianten beobachtet werden (Hunger *et al.*, 2014). Dies stellt unter Beweis, wie wichtig die Konstriktionen für die kontrollierte Anionen-Translokation sind und, dass eine artifizielle Erweiterung der Pore (durch Austausch mit sehr kleinen Aminosäuren) dafür sorgt, dass diese „undicht“ wird. Wie schon beschrieben, sind die Durchmesser der Konstriktionen der FNTs, insbesondere der cytoplasmatischen Engstelle, welche auf Basis der Röntgenkristallstrukturdaten bestimmt wurden, zu gering, als dass die namensgebenden Ionen passieren können. Im Fall von Efflux- und Influx-Prozessen muss es daher zu einer Erweiterung kommen. Für *EcFocA* wurde postuliert, dass diese durch Änderung der Rotamer-Konformationen der Seitenketten von L79 und L89 bzw. F75 und F202 gewährleistet werden könnte, was ähnlich zu den in Aquaporinen beschriebenen Konformationsänderungen ist (Gonen *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009). Einen strukturellen Nachweis gibt es dafür jedoch bisher nicht. Darüber hinaus spielen besonders die beiden konservierten Phenylalanine eine wichtige Rolle, da sie sich in der unmittelbaren Nähe (< 3 – 4 Å) des Imidazol-Rings des zentralen Histidins befinden und durch die

aromatischen Systeme π - π -Wechselwirkungen stattfinden. Diese nicht kovalenten Wechselwirkungen stabilisieren das Histidin und verstärken dessen Polarität.

Weiterführende Analysen, welche die Bedeutung der konservierten Aminosäuren analysierten, zeigten, dass N172 und N262 in wichtige Wechselwirkungen im Translokationsnetzwerk (mit T91 und H209) involviert sind, da entsprechende Aminosäure-Austauschvarianten inaktiv in der bidirektionalen Formiat-Translokation bzw. Hypophosphit-Aufnahme waren (Kammel und Sawers, 2022b). Eher strukturelle Bedeutung, aber keine Relevanz für den Translokationsmechanismus hatten hingegen die teilweise stark konservierten Aminosäuren D88, E208, S210 und N213 (Kammel und Sawers, 2022b).

Insbesondere im von E. Beitz und Kollegen postulierten Translokationsmechanismus, dem Modell der elektrostatischen Anziehung der Ionen bzw. Verschiebung deren Azidität, welches in Abschnitt 1.3.3 in Abbildung 10b schematisch dargestellt ist, wird die funktionelle Bedeutung von zwei konservierten Lysinen (K26 und K156), welche im cytoplasmatischen bzw. periplasmatischen Vorraum der Pore positioniert sind, in den Fokus gestellt. Nach Wiechert und Beitz (2017) tragen diese positiv geladenen Seitenketten dazu bei, dass die monovalenten Anionen durch elektrostatische Anziehung in die Pore „gezogen“ werden. Die Lysine sind zudem Teil von Salzbrückentriaden (beispielsweise K156-E208-N213) und Czyzewski und Wang schrieben ihnen 2012 die Funktion als pH-Sensoren zu. Die Relevanz der Lysine für den Translokationsmechanismus konnte auch experimentell mit den in der Dissertation verwendeten Methoden bestätigt werden (Kammel und Sawers, 2022b; Abbildung A8 im Anhang, unpublizierte Daten von M. Kammel und G. Sawers). Jedoch sind die Lysine im Gegensatz zum Modell von Beitz nicht die Hauptdeterminanten, welche die Formiat/Anionen-Translokation beeinflussen, sondern vielmehr ein Teil des Netzwerkes der Aminosäuren, die mit den zu translozierenden Anionen wechselwirken und so eine kontrollierte Passage durch die Pore bewirken.

Einen weiteren wichtigen Beitrag diesbezüglich könnten die vielen stark konservierten Glycine: G42, G78, G86, G120, G206, G262, G265 und G266 leisten (vgl. Abb. A3a). In vielen Enzymen, insbesondere in aktiven Zentren von Proteasen, bilden Glycine Oxyanionen-Löcher und stabilisieren negative Ladungen, im Speziellen die Übergangszustände von Reaktionen (Berg *et al.*, 2012). Daher kann auch in FNTs für Glycine eine ähnliche Aufgabe angenommen werden, das heißt sie stabilisieren die zu translozierenden Anionen oder auch die deprotonierte Hydroxyl-Funktion des Threonins, sollte dieses direkt in den Translokationsmechanismus involviert sein. Die Positionierung der Glycine könnte daher einen möglichen Translokations-Pfad der Anionen/Formiat-Ionen in der Translokationspore andeuten (vgl. Abb. A3b) und die Energiebarriere des Transportes dieser herabsetzen. Obwohl FNTs in einigen Punkten Enzym-ähnliche Eigenschaften aufweisen (wie beispielsweise Transferasen oder Proteasen), ist es sehr wichtig, den Translokationsmechanismus von enzymatischer Katalyse abzugrenzen.

3.3. Translokationsmechanismen von FocA als Vertreter der FNT-Familie

Im Folgenden sollen die Daten, die in der Dissertation präsentiert wurden und in weiteren Publikationen beschrieben wurden, in Zusammenhang mit Mechanismen aus der Literatur u.a. auch von anderen ähnlichen Ionen-Kanälen und Transportern gebracht und ein hypothetischer Mechanismus für die Formiat-Translokation in FocA vorgeschlagen werden..

3.3.1 Translokationmechanismen von Ionen-Kanälen und anderen strukturell ähnlichen Proteinen

FNTs sind Aquaporinen und Glycerol-Kanälen trotz geringer Übereinstimmung auf Primärstrukturebene strukturell sehr ähnlich (Sequenzidentität zwischen *E. coli* FocA und AqpZ bzw. GlpF 21,3 % bzw. 23,1 %; berechnet mit CLUSTAL OMEGA; Webserver Version 1.2.4; Madeira *et al.*, 2022). AqpZ und GlpF weisen mit den unterbrochenen Helices TM2 und TM5 die gleiche Topologie wie FocA auf (Fu *et al.*, 2000; Savage *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2009). Kleinere Unterschiede in der Position der transmembranen Helices sind darauf zurückzuführen, dass Wasser- und Glycerol-Kanäle *in vivo* als Homotetramere, FocA und FNTs hingegen als Homopentamere vorkommen. In Glycerol- und Wasserkanälen wird die spezifische Translokation der namensgebenden Moleküle durch Selektivitätsfilter, die sich vor allem durch hydrophobe und positiv geladene Seitenketten am Aus- bzw. Eingang der Pore auszeichnen, gewährleistet (Fu *et al.*, 2000; Savage *et al.*, 2003). In *EcGlpF* sorgen W48 und F200 für eine hydrophobe Umgebung an der periplasmatischen Konstriktion und zudem vermittelt R206 über Wasserstoffbrückenbindung Wechselwirkungen zu den Hydroxyl-Funktionen des Glycerols, wodurch dieses in den periplasmatischen Vorraum der Pore zu den Konstriktionen geleitet wird (Fu *et al.*, 2000). In *EcAqpZ* wird die periplasmatische Konstriktion durch die Aminosäuren F43, H174, T183 und R189 gebildet und es gibt auf der B- und E-Schleufe (ähnlich zur Ω und S-Schleufe in FNTs) jeweils Struktur motive aus Asparagin-Prolin-Alanin (NPA-Motiv), welche wesentlich zur Selektivität beitragen, indem sie mit den zu translozierenden Wassermolekülen interagieren, aber das Passieren von Ionen verhindern (Sui *et al.*, 2001). Anders als in FNTs sind in Wasserkanälen die Peptidrückgrat-Carbonyl-Gruppen der Aminosäuren, und nicht die Seitenketten, in Richtung der Translokationspore angeordnet (Sui *et al.*, 2001). Dies ist mechanistisch bedeutsam, da so Wasserstoffbrückenbindungen zu den zu transportierenden Wassermolekülen ausgebildet werden können und so eine Bewegung dieser durch die Pore begünstigt wird. In FocA übernehmen die Phenylalanine 75 und 202 der periplasmatischen Konstriktion und auch K156 ähnliche Funktion in der Anziehung bzw. Wechselwirkung mit den zu transportierenden Molekülen wie beschriebene Aminosäuren in AqpZ und GlpF (Wang *et al.*, 2009). Auch wenn es in Wasser- und Glycerolkanälen ein konserviertes Histidin im zentralen Teil der Pore gibt (in den *E. coli* Proteinen H174 bzw. H191), scheint sich die Aufgabe nicht mit der in den FNTs zu decken. Generell kann, obwohl sich die Translokationsporen grundsätzlich strukturell sehr ähnlich sind, aufgrund verschiedener chemischer Charakteristika der zu transportierenden Moleküle, erwartet werden, dass sich mechanistische Details der Translokation unterscheiden.

Weniger strukturelle Übereinstimmung, aber grundsätzlich ähnliche Prinzipien zu den FNTs könnten möglicherweise Anion- und Kationen-Kanäle aufweisen. Die wohl am besten charakterisierten Anion-Kanäle gehören zur Familie der ClCs (Chlorid-Kanäle). Auf Basis von elektrophysiologischen und

Struktur-determinierenden Studien wurden die fast ubiquitär vorkommenden CIC-Mitglieder sowohl als klassische Kanäle, aber auch als sekundär aktive Transporter, welche zudem Protonen translozieren, eingruppiert (Miller, 2006). Generell ist die Permeation von der Konzentration der Chlorid-Ionen, pH und Spannung abhängig und im Mechanismus spielt ein stark konserviertes Glutamat (in *E. coli*-CIC E148) im Proteininneren eine wesentliche Rolle (Dutzler *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Eigenschaften ist, obwohl in *in vitro* Studien für FNTs die Translokation von Chlorid-Ionen gezeigt wurde, nicht davon auszugehen, dass sich CICs und FNTs mechanistisch ähneln (Lü *et al.*, 2012a). Auch für die in der Regel Spannungs- und Liganden-kontrollierten Na⁺, K⁺ Ca²⁺ oder Mg²⁺-Ionen-Translokatoren gilt, dass diese sich nicht nur in der Regulation, sondern daher auch in weiteren mechanistischen Details des Transportes unterscheiden.

Größere Parallelen hingegen existieren zu einem Ammonium-Translokator: AmtB aus *E. coli*. Im Gegensatz zu FNTs wurde für AmtB postuliert, dass der Translokator keinen Selektivitätsfilter ausweist, welcher die Spezifität der zu translozierenden Ionen gewährleistet (Javelle *et al.*, 2006). Stattdessen wird über den Translokationsmechanismus reguliert, dass keine anderen monovalenten Kationen, sondern nur spezifisch Ammonium-Ionen transloziert werden, was durch einen Deprotonierungsschritt der NH₄⁺-Ionen sichergestellt wird (Khademi *et al.*, 2004). So kann Ammonium in Form von Ammoniak den zentralen Teil der Pore passieren. AmtB weist ein zentrales Doppel-Histidin-Motiv auf (in *Ec*AmtB H168 und H318), welches für die Translokation und Spezifität essentiell ist (Javelle *et al.*, 2006; Williamson *et al.*, 2022). Weiterhin gibt es zwei Wasser-Leitwege (*water wires*), welche durch eines der konservierten Histidine verbunden sind und welche dafür sorgen, dass die Protonen, welche bei der Deprotonierung von NH₄⁺ entstehen, auch mit ins Cytoplasma geleitet werden (Williamson *et al.*, 2022). Das AmtB-Wildtyp-Protein gewährleistet so als sekundär aktiver Transporter die spezifische Aufnahme von Ammonium-Ionen. Wurden die zentralen Histidine substituiert, so beobachteten Williamson *et al.*, 2022 dass die AmtB-Variante ein eher Kanal-artiges Translokations-Verhalten mit deutlich reduzierter Selektivität aufwies, was mit der veränderten Hydrophobizität der zentralen Pore begründet wurde. Dieses Verhalten weist Gemeinsamkeiten mit dem als „Uniporter“ funktionierenden FocA_{H209A/I/N/Q/T}-Varianten auf. Außerdem wurde postuliert, dass es ähnlich wie bei den FNTs zur Erweiterung der Konstriktionen kommen muss, aber es konnten in den AmtB-Strukturen keine verschiedenen Konformationen nachgewiesen werden (Khademi *et al.*, 2004).

3.3.2 Konformationen der Ω-Schleife von FNTs

Bei einigen FNTs wurden unterschiedliche Konformationen der Protomere, welche sich im Wesentlichen in der Orientierung der Ω-Schleife unterscheiden, gezeigt (vgl. Abschnitte 1.3.2 und 1.3.3). Da es für die Beschreibung der Translokation notwendig ist, den „geschlossenen“ und „geöffneten“ Zustand des Protomers zu differenzieren, soll an dieser Stelle eine nähere Betrachtung dieses Aspektes erfolgen.

Einige Strukturbiologen bezeichnen die Konformation von StNirC bzw. CdHSC, in welcher das konservierte Threonin und Histidin im Abstand von 3,0 bzw. 2,8 Å, also in Wasserstoffbrückendistanz zueinander liegen, als „geschlossenen“ Zustand (Lü *et al.*; 2012b; Waight *et al.*, 2010; Czyzewski und Wang, 2012). Im Gegensatz zu dieser Hypothese, scheint es schlüssiger, und dies ist auch die in der

Doktorarbeit bevorzugte Auffassung, dass die „offene“ Konformation des Kanals dadurch definiert ist, dass der Abstand zwischen Threonin und Histidin kleiner oder gleich 3 Å ist. Dies bedeutet, dass die Ω -Schleife in Richtung der cytoplasmatischen Konstriktion orientiert ist (nachfolgend bezeichnet als „oben“-Konformation). Der „geschlossene“ Zustand der Pore ist damit definiert als „unten“-Konformation der Ω -Schleife, wobei diese sich ca. 5 Å in Richtung des Cytoplasmas bewegt. In dieser Konformation beträgt der Abstand zwischen den beiden mechanistisch bedeutsamen Aminosäuren mind. 5 Å, wie es auch für die initiale *EcFocA* Struktur und auch Protomere von *VcFocA* determiniert wurde (PDB:3KCU; Wang *et al.*, 2009 bzw. PDB:3KLY; Waight *et al.*, 2010). Für *VcFocA* konnte festgestellt werden, dass ein Wasser-Molekül die Position des Threonins einnimmt und mit Histidin interagiert, wenn sich die Ω -Schleife in der „unten“-Konformation befindet (Waight *et al.*, 2010). Zudem lässt sich anhand der in Abbildung 9 visualisierten Positionen der Ω -Schleife der Protomere von *VcFocA* erahnen, dass eine konformationelle Verschiebung dieser Schleife die Passage der zu translozierenden Ionen begünstigt und eine Protonierung bzw. die Rückführung des Protons auf die entsprechenden Aminosäure-Seitenketten nahe des Zentrums der Pore vermittelt. Deshalb ist auch anzunehmen, dass es während der Translokation zur Bewegung der Ω -Schleife in die „oben“-Konformation kommt, was durch die Interaktion von dem cytoplasmatischen Interaktionspartner mit dem *N*-Terminus des FNTs vermittelt wird.

Generell ist neben den verschiedenen Orientierungen der Ω -Schleife und des konservierten Threonins der FNTs auch die Variation deren Länge bzw. die der transmembranen Helix 2b (TM2b) auffällig (vgl. Abb. A5 im Anhang). In der *EcFocA*-Struktur (PDB: 3KCU; Wang *et al.*, 2009) ist die Ω -Schleife in allen Protomeren sechs Aminosäuren lang, hingegen bei *StFocA* (PDB: 3Q7K; Lü *et al.*, 2011), welches 95,8 % Sequenzidentität zu *EcFocA* aufweist, der helikale Bereich (TM2b) als verlängerte Ω -Schleife mit einer Länge von 18 bis 22 Aminosäuren vorliegt (Abb. A5a und b). In *VcFocA* (PDB: 3KLY; Waight *et al.*, 2010) ist die Ω -Schleife je nach Protomer-Konformation 5 - 22 Aminosäuren lang (Abb. A5d und e). Eine direkte Korrelation zwischen der Konformation und der Länge der Ω -Schleife lässt sich daher nicht ableiten. Dennoch unterstreichen die strukturellen Unterschiede die notwendige Flexibilität dieses Proteinbereiches und dessen Implementierung in der Konformationsänderung, welche für die Translokation, zumindest die Aufnahme von Formiat, essentiell ist.

Allgemein ist es ein wenig spekulativ aus den Strukturdaten der FNTs, welche in allen Fällen ohne die Interaktionspartner bestimmt wurden, Aussagen zur mechanistischen Details der Formiat-Translokation abzuleiten. Dass sich T81 in *StNirC* bzw. T84 in *CdHSC* (entspricht T91 in *EcFocA*) direkt am Anfang der Helix TM2b befinden und die Kristallstrukturdaten ebenfalls stark verkürzten Ω -Schleifen andeuten (vgl. Abb. A5c und f), deutet jedoch an, dass sich die mechanistische Fein-Regulierung bzw. konformationellen Änderungen zwischen den FNTs unterscheiden könnte. Für HSC wurde zudem postuliert, dass das Öffnen und Schließen der Pore stärker als bei anderen FNTs reguliert ist und sich die *CdHSC*-Protomere im Vergleich zu *EcFocA* zu einer geringeren Wahrscheinlichkeit in der „offenen“ Konformation befinden (Czyzewski und Wang, 2012). Dies könnte in Zusammenhang mit den unterschiedlichen Energiebarrieren für die Passage der Ionen stehen. Um die Unterschiede in den Translokationsmechanismen u.a. in Bezug auf Konformationsänderungen zu verifizieren, benötigt man jedoch mehr *in vivo* Aktivitäts-Experimente und Strukturdaten der FNTs mit deren Interaktionspartnern.

3.3.3 Direktionalität der Translokation von FNTs

Vergleicht man die drei am besten charakterisierten Vertreter der FNTs – FocA, NirC und HSC – in Hinblick auf die Lokalisierung der potenziell interagierenden Enzyme, so fällt auf, dass diese im Cytoplasma zu finden sind. Das Formiat aufnehmende Protein McFdhC hingegen ist der einzige Kanal ist, dessen möglicher Interaktionspartner, FDH, im Periplasma aktiv ist (White und Ferry, 1992; Nölling und Reeve, 1997). Ob und wie FDH FdhC direkt beeinflusst, ist bisher nicht geklärt (vgl. Abschnitt 3.1.3).

Allgemein scheint die Lokalisierung des Interaktionspartners der FNTs keine Determinante für die Translokationsrichtung zu sein. Dies sieht man beispielsweise bei NirC, dessen Hauptfunktion *in vivo* der Nitrit-Import ist, aber möglicherweise gewährleistet NirC auch bei erhöhter intrazellulärer Nitrit-Konzentration dessen Efflux (Rycovska *et al.*, 2012; Lü *et al.*, 2013). Es resultiert daher die Frage, ob und wie die cytoplasmatisch lokalisierte Nitritreduktase die Nitrit-Aufnahme von NirC beeinflussen kann. Es ist vorstellbar, dass es bei NirC-NirBD-Interaktion zu weitreichenderen konformationellen Änderungen kommt, wodurch die Konstriktionen, welche die Passage der Ionen verhindern, erweitert werden. Auch im Fall von FocA ist nicht bekannt, wie PflB im Detail die Formiat-Aufnahme beeinflusst. Es stellen sich daher die Fragen, welche konformationellen Änderung im Protein dabei passieren und ob es auch noch einen periplasmatischen Interaktionspartner gibt, der die Aufnahme von Formiat beeinflusst (3.1). Im Hydrosulfid-Kanal CdHSC, welcher unter physiologischen Bedingungen toxisches Hydrosulfid aus den Zellen transloziert, befindet sich die Sulfitreduktase, das Enzym welches die Bildung von Hydrosulfid katalysiert, im Cytoplasma (Czyzewski und Wang, 2012). Gewisse Parallelen zur FocA-PflB-Interaktion liegen nahe und implizieren, dass die Sulfitreduktase mit dem N-Terminus von HSC interagieren könnte und die produzierten Ionen in den Kanal leitet, was jedoch experimenteller Bestätigung bedarf.

Neben dem Interaktionspartner, welcher auf die Steuerung der Translokation und damit auch auf dessen Direktionalität Einfluss hat, kommt dem oft direkt damit verbundenen Konzentrationsgefälle (vor allem bei Kanal-artigen Translokationsmechanismen) eine wesentliche Funktion zu. Dies sieht man beispielsweise an FocA, durch welches zunächst nur der Formiat-Efflux und erst in späteren Wachstumsphasen dessen Wiederaufnahme in die Zelle erfolgt, und auch an HSC, welches Hydrosulfid-Ionen aus dem Cytoplasma transloziert. Außerdem spielt oft auch der pH-Wert eine entscheidende Rolle bei der Direktionalität der Ionen-Translokation (Suppmann und Sawers, 1994). So findet, wie im Modell der pH-abhängigen Formiat-Translokation (Abschnitt 1.3.3) beschrieben, beim Unterschreiten des pH-Wertes von 6,8 ein Wechsel des Translokationsmodus von Efflux zu Influx statt (Lü *et al.*, 2011).

Nicht zu vergessen sind weitere metabolische Faktoren, denn oft ist die Translokation und deren Direktionalität entscheidend für die Energiekonservierung des Mikroorganismus. Der Transport der Anionen bzw. Protonen kann einen wichtigen Beitrag zur Ladungstrennung und dem Aufbau des elektrochemischen Protonengradienten leisten (Details siehe Abschnitt 3.3.4). Dies ist relevant, da die anoxische Energiekonservierung bei der gemischten Säuregärung deutlich geringer ist, als der von Proteobakterien bevorzugte Energiekonservierungsweg der aeroben oder gar anneroben Respiration (Unden und Dünwald, 2008). Der Translokationsmechanismus sollte daher für das Bakterium auch energetisch vorteilhaft sein.

3.3.4 Hypothetische Mechanismen der Translokation in *E. coli* FocA

In diesem Abschnitt werden die hypothetischen Modelle der Translokationsmechanismen der FNTs für den Formiat-Efflux und auch für dessen Aufnahme von Formiat vorgestellt.

E. coli produziert unter anaeroben Bedingungen durch die gemischten Säuregärung PflB-abhängig Formiat. Durch die direkte Interaktion von PflB mit dem FocA *N*-Terminus (3.1.1) werden die Formiat-Ionen und im Co-Transport dazu Protonen direkt in die Translokationspore geleitet. Durch die Wechselwirkung der beiden Proteine, kommt es vermutlich zu konformationellen Änderungen, sodass die Durchmesser der cyto- und periplasmatischen Konstriktionen erweitert werden. Die Formiat-Ionen gelangen in den cytoplasmatischen Vorraum der Pore, vermutlich indem sie durch positive Seitenketten wie K26 angezogen werden. Die Anionen müssen, um den hydrophoben Teil der Translokationspore passieren zu können, protoniert werden. Dies könnte hypothetisch durch ein co-transloziertes Proton erfolgen und auch das konservierte Threonin könnte dabei, vermutlich aber nur indirekt, involviert sein. Dabei könnte die Orientierung der Seitenkette von T91 entscheidend sein, welche durch PflB, das als „gate keeper“ nicht nur den Poreneingang freigibt, sondern auch die Position der *N*-terminalen Helix beeinflusst. Dadurch würde die damit in Verbindung stehende Ω -Schleife in die „oben“ Position verschoben werden, sodass T91 zu H209 in Wasserstoffbrückendistanz gelangt. Der Einfluss von T91 lässt sich damit erklären, dass es in FocA_{T91}-Austauschvarianten, mit Ausnahme Hydroxyl-Gruppe aufweisender Aminosäuren, zur intrazellulären Formiat-Akkumulation kam (Kammel und Sawers, 2022a; Kammel *et al.*, 2022b; Abschnitt 3.2.2). Dass Histidin die Protonierung des Ions übernimmt ist unwahrscheinlich, da dieses für den Formiat-Efflux nicht essentiell ist (Kammel *et al.*, 2022a). Dennoch ist H209 vermutlich wichtig für eine gut regulierte bidirektionale Translokation. Nach dem Passieren der periplasmatischen Konstriktion, welche bei höherem pH-Wert erweitert ist, wie *in silico* Analysen vermuten lassen, dissoziiert die Ameisensäure (Feng *et al.*, 2012). Das Anion könnte im nächsten Schritt durch elektrostatische Wechselwirkungen mit K156 durch den periplasmatischen Vorraum der Pore geleitet werden und mit dem Proton im Periplasma entlassen werden.

Experimentelle Beweise, dass es sich um Formiat/H⁺-Efflux handelt, lieferten Protonen-Flux-Studien in Kooperation mit L. Vanyan und K. Trchounian (Yerevan Universität, Armenien). In den Versuchen wird die Abhängigkeit des Protonen-Fluxes von der F₁F₀-ATPase-Aktivität in verschiedenen *E. coli* Stämmen, welche natives (DH4100), FocA_{H209N} (DH4200) oder kein FocA (DH701) synthetisieren, verglichen. Da in DH701 der prozentuale Anteil am Protonenfluss der F₁F₀-ATPase sehr viel höher als in DH4100 war, wurde abgeleitet, dass FocA Protonen transloziert. Darüber hinaus konnte für DH4200, welches verstärkte Formiat-Effluxaktivität aufwies, sowohl eine höhere F₁F₀-ATPase-abhängige Protonen-Translokation als auch stärkerer Protonenfluss *via* FocA beobachtet werden (unveröffentlichte Ergebnisse; Methode ähnlich wie in Vanyan und Trchounian, 2022).

Dass pro Formiat-Ion ein H⁺ ins Periplasma transloziert wird, sorgt für den Aufbau des Protonengradienten, bedeutet aber auch, dass kein zusätzlicher Beitrag zur Ladungstrennung geleistet wird, was wiederum nicht für Energiekonservierung sorgt. Dennoch ist es wichtig, dass der Formiat-Akkumulation und auch der Ansäuerung im Cytoplasma (durch andere organische Säuren) vorgebeugt wird. Dies effizient mit hohe Transportraten zu gewährleisten, ist die Aufgabe von FocA, dessen Formiat/H⁺-Efflux daher sehr wahrscheinlich nach einem Kanal-artigem Mechanismus funktioniert (vgl. Abbildung 13b).

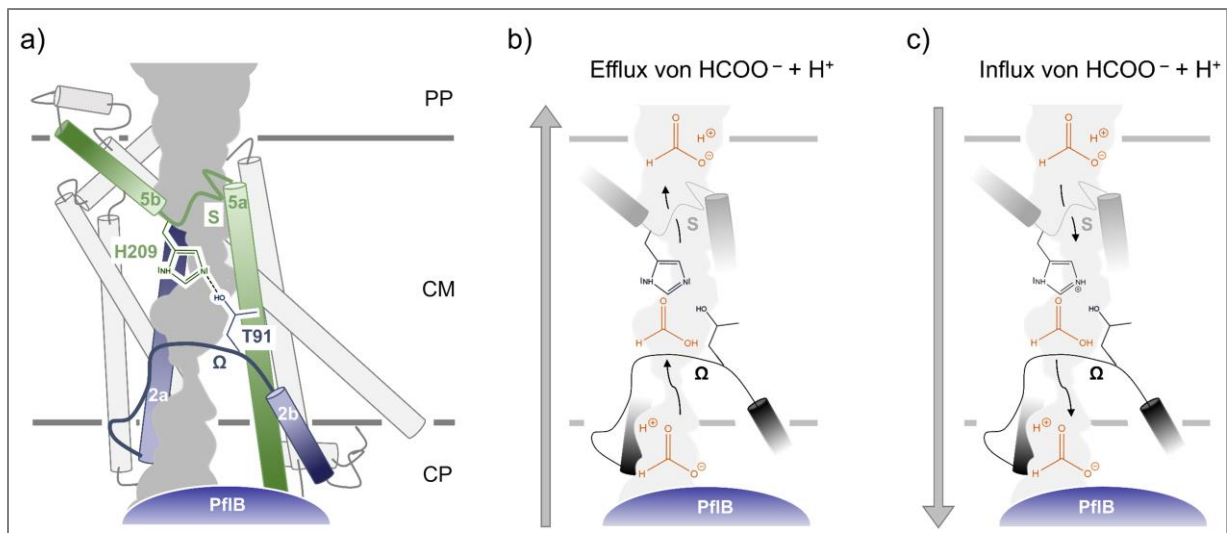


Abbildung 13: Hypothetisches Modell der Kanal-artigen Formiat-Translokation via FocA.

a) Schematische Darstellung eines *E. coli* FocA Protomers mit der Translokationspore (in Dunkelgrau) basierend auf der Kristallstruktur von Wang *et al.*, 2009 (PDB: 3KCU; Modellierung der Pore mit dem PyMOL *plug-in* MOLE, Pravda *et al.*, 2018). Die Sekundärstrukturelemente sind gezeigt mit den α -Helices als Zylindern. Besonders hervorgehoben sind die transmembranen Helices 2a und 2b (in Blau), welche durch die Ω -Schleife mit T91 verbunden sind, sowie Helix 5a, Helix 5b und die S-Schleife (in Grün). Die Orientierung der konservierten Aminosäure-Seitenketten T91 und H209, welche über eine Wasserstoffbrückenbindung (gestrichelte Linie; Abstand $< 3\text{\AA}$) miteinander interagieren, ist schematisch gezeigt. Die Interaktion von PflB (in Blau) und dem N-Terminus von FocA sorgt für die „offene“ Konformation. Die Position des FocA Protomers in der Membran (CM) ist angezeigt und die Beschriftung von Cytoplasma (CP) und Periplasma (PP).

b) Hypothetischer Mechanismus des Formiat-Effluxes in der exponentiellen Wachstumsphase. PflB (in Blau) produziert Formiat (orangenes Molekül) und bei einem pH $> 6,8$ wird dieses zusammen mit einem Proton aus dem Cytoplasma transloziert, wenn sich das Protomer im „geöffneten“ Zustand befindet (T91 und H209 interagieren über eine Wasserstoffbrücke). Das zu transportierende Molekül passiert die hydrophobe Pore als Ameisensäure.
 c) Sinkt der pH im Laufe der gemischten Säuregärung unter 6,8 und liegt Formiat in großem Überschuss vor, dann wird dieses vermutlich im Co-Transport mit Protonen ins Cytoplasma transloziert. Die Pfeile zeigen jeweils die Richtung der Translokation des Ions bzw. der Säure an.

Es stellt sich die Frage, ob auch der Formiat-Influx nach einem Kanal-artigem Mechanismus funktioniert. Die Antwort darauf lautet Ja und Nein. Denn auf Grundlage der Daten von Metcalfe *et al.*, 2022; lässt sich ableiten, dass es zwei verschiedene Translokationsmodi gibt. So ist davon auszugehen, dass bei sehr hoher exogener Formiat-Konzentration, Formiat aufgrund des Konzentrationsgefälles über einen Kanal-artigen Mechanismus aufgenommen wird (vgl. Abschnitt 3.1.4, Metcalfe *et al.*, 2022; siehe Abbildung 13c). Um der starken pH-Wert Absenkung im Periplasma entgegenzuwirken, könnte eine direkte Kopplung mit dem FHL-1-Komplex die Rate der Translokation erhöhen. Konformationelle Änderungen in der Translokationspore von FocA besonders im Bereich der Konstriktionen, welche vermutlich auch durch die Interaktion mit PflB (oder weiteren interagierenden Proteinen) gesteuert werden, sind dabei ähnlich wie beim Formiat-Efflux zu erwarten. Darüber hinaus implizieren die Daten im Stammhintergrund DH601 (*focA pflA*-Mutante) bzw. DH701 (*focA*-Mutante), wobei diese mit 20 mM Natriumformiat kultiviert wurden, dass H209 eine wichtige Funktion in der Protonierung der Anionen hat, um die Passage durch den hydrophoben Bereich der Pore zu ermöglichen (Kammel *et al.*, 2022b).

Unter physiologischen Bedingungen sollte diese im letzten Absatz beschriebene Aufnahme von im Überschuss vorliegendem Formiat jedoch keine wesentliche Rolle spielen. Vielmehr von Bedeutung für Mikroorganismen wie *E. coli* ist die sehr stark kontrollierte und pH-Wert abhängige Wiederaufnahme

des durch PflB-produzierten Formiats. Ein hypothetisches Modell der einzelnen Schritte der Formiat-Translokation ist in Abbildung 14 gezeigt und die einzelnen Teilschritte werden nachfolgend erläutert. Initiiert wird die Wiederaufnahme des Formiats in FocA durch das Absinken des pH-Wertes (Suppmann und Sawers, 1994; Lü *et al.*, 2011). Der Eintritt der Formiat-Ionen in den periplasmatischen Vorraum wird durch die positiv geladene Seitenkette von K156 mittels elektrostatischer Anziehung erleichtert und die Ionen werden zur Konstriktion geleitet. Nachdem das N δ_1 -Atom des Histidins 209 durch ein Proton aus dem periplasmatischen Vorraum in die kationische Imidazolium-Spezies überführt wurde (Schritt 1; Abb. 14a), ist es in der Lage Formiat zu protonieren (Schritt 2). Dieses kann als Ameisensäure den zentralen, hydrophoben Teil der Pore überwinden. Das Imidazolium-Kation wird wiederhergestellt, indem die Hydroxyl-Funktion von T91 deprotoniert wird (Schritt 3). Eine konformationelle Änderung in FocA sorgt dafür, dass die Ω -Schleife sich vom Histidin weg in die „unten“ Position bewegt. Die translozierte Ameisensäure protoniert dabei T91 (Schritt 4). Nachdem das Formiat-Ion die Pore passiert hat (Schritt 5), erfolgt in Schritt 6 eine erneute Konformationsänderung, sodass sich T91 wieder in Wasserstoffbrückenbindungsdistanz zu H209 befindet und der Ausgangszustand für die Formiat-Aufnahme wiederhergestellt wird. Nachdem das Formiat-Ion die cytoplasmatische Konstriktion passiert hat, wird es vermutlich über elektrostatische Anziehung (K26) durch den cytoplasmatischen Vorraum der Pore geleitet und ins Cytoplasma entlassen. Moleküldynamiksimulationen implizieren, dass bei geringem pH, wenn H209 als Imidazolium-Kation vorliegt, die cytoplasmatische Konstriktion erweitert ist, was das Entlassen des Anions ins Cytoplasma unterstützt (Feng *et al.*, 2012).

In vivo Versuche konnten nicht eindeutig belegen, ob der Import von Formiat-Ionen im Co-Transport mit Protonen stattfindet. Daten von L. Vanyan und K. Trchounian geben erste Hinweise darauf, bedürfen aber weiterer Bestätigung. Dieser mit einem sekundären Transporter vergleichbare Formiat/H⁺-Translokationsmodus erscheint schlüssig, da der FHL-1-Komplex Formiat-Ionen und H⁺ zu CO₂ und H₂ umsetzt und die Translokation fördert, da die Substrate der Reaktionen somit der Zelle entzogen werden. Aus energetischen Gründen wäre die H⁺-Co-Translokation für das Bakterium dann günstig, wenn diese direkt durch den FHL-1-Komplex umgesetzt werden und es formal zur Ladungstrennung kommt.

Ein zentraler Punkt des beschriebenen Import-Mechanismus, welcher vermutlich wesentlich komplexer als der Formiat-Efflux ist, ist die Protonierung des Anions durch H209 und auch die Involvierung von T91. Dies lässt sich vor allem durch die experimentellen Daten mit dem Formiat-Analogon Hypophosphit erklären. Wenn die Sensitivität der mit FocA_{H209} bzw. FocA_{T91}-Varianten komplementierten Zellen untersucht wurde, dann fand, obwohl die Hypophosphit-Konzentration im millimolaren Bereich lag, keine Reduktion der Wachstumsrate, also auch kein Import statt (Kammel *et al.*, 2022b). Dass weder Hypophosphit noch Formiat durch die FocA_{H209} bzw. FocA_{T91}-Varianten (mit Ausnahme von FocA_{T91S/Y}) aufgenommen wurde, impliziert, dass ein aktiver Transportprozess stattfinden muss. Desweiteren ist die Aufnahme von Formiat stärker durch physiologische Bedingungen (pH und Konzentration der Formiat-Ionen) und Wechselwirkungen mit anderen Enzymen (Abschnitt 3.1.1 und 3.1.4) beeinflusst. Den sekundär aktiven Transportmechanismus begründen auch die vielen und umfassenderen konformationelle Änderungen im Protein während der Translokation (vgl. Abschnitt 3.3.2). Diese Änderungen sorgen dafür, dass FocA entweder in der „geschlossenen“ oder „offenen“ Konformation vorliegt, wie es auch die Kristallstrukturdaten der FNTs andeuten (Lü *et al.*, 2011 und 2012a).

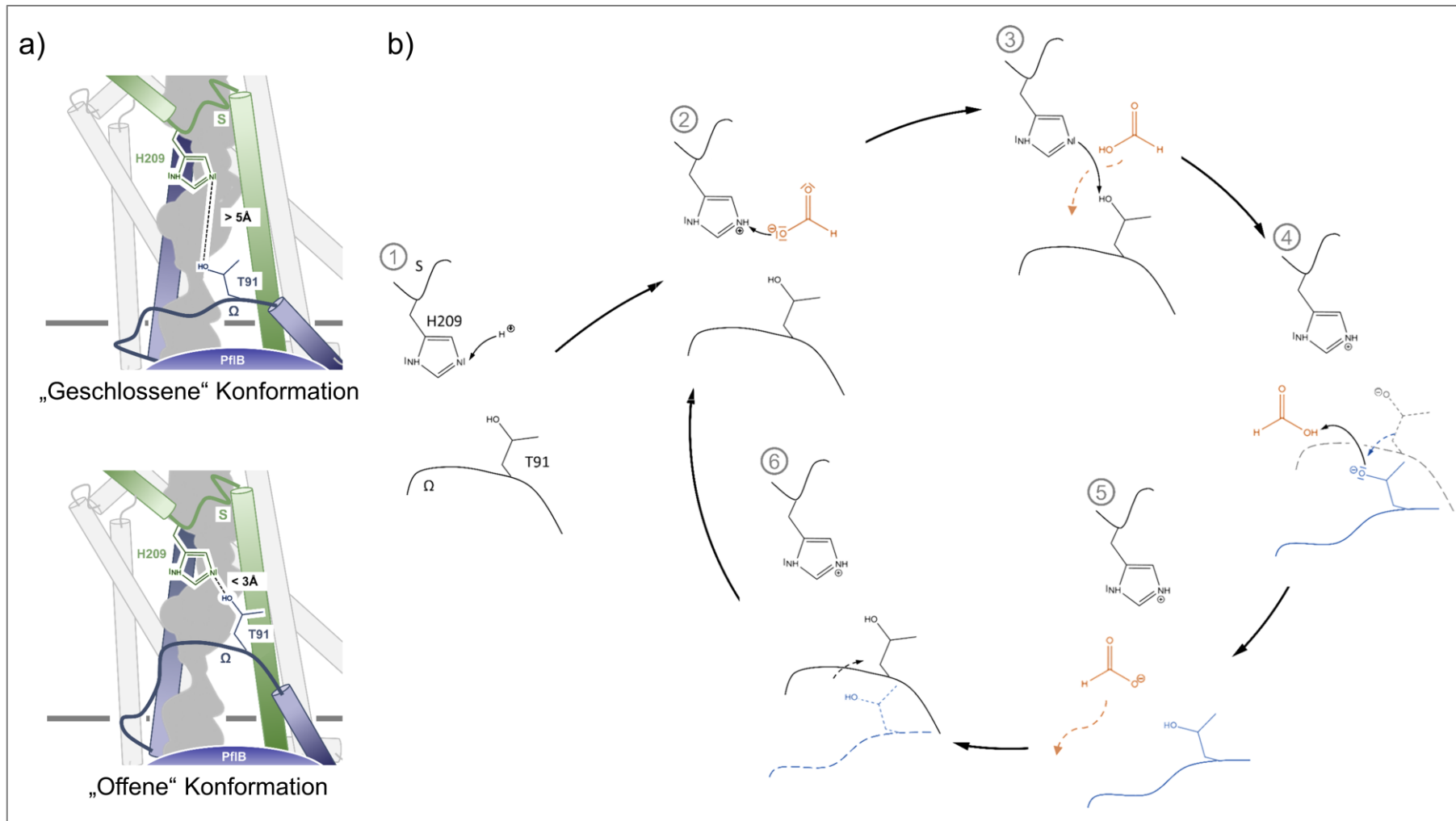


Abbildung 14: Hypothetisches Modell der Formiat-Aufnahme mittels sekundär aktivem Transport *via* FocA.

a) Konformationen der Ω -Schleife, welche für den „offenen“ oder „geschlossenen“ Zustand der Translokationspore sorgen. Die Abbildungen wurden entsprechend der schematischen Darstellung von Abb. 13a erstellt. Je nach Konformation unterscheidet sich die Orientierung und der Abstand des konservierten T91 zu H209 und ob diese über eine Wasserstoffbrücke interagieren, was nur in der „offenen“ Konformation bei einem Abstand $< 3\text{\AA}$ möglich ist.

b) Hypothetische mechanistische Details des Imports von Formiat-Ionen und H^+ durch einen sekundär aktiven Transportprozess, dessen Einzelschritte in Abschnitt 3.3.4 erklärt sind.

3.3.5 Ist FocA ein „Ionen-Kanal-Transporter-Hybrid“?

Aus dem vorgeschlagenen Mechanismus, der sich je nach Direktionalität der Translokation unterscheidet und aufgrund dessen eine einfache Klassifizierung von FocA als Ionen-Kanal oder sekundär aktiver Transporter nicht erfolgen kann, resultiert die Frage, ob FocA ein Hybrid-Protein ist.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung kann man zwei Optionen in Betracht ziehen. Sollte FocA ein „Ionen-Kanal-Transporter-Hybrid“ sein, bedeutet dies, dass in einem Pentamer verschiedene Protomer-Zustände vorliegen, sodass jederzeit das Potential vorhanden ist, dass beide Transportmodi unterstützt werden bzw. Formiat-Efflux und –Influx mehr oder weniger parallel stattfinden. Auch wenn in *EcFocA* alle Protomere des Pentamers nahezu deckungsgleich sind, was sich in einem RMSD-Wert von 0,7 Å widerspiegelt, wurde anhand der Kristallstruktur von *VcFocA* gezeigt, dass in einem Pentamer mehrere konformationelle Zustände („offener“, „geschlossener“ bzw. „intermediärer“ Zustand der Translokationspore) existieren können (Wang *et al.*, 2009; Waight *et al.*, 2010). Im Zusammenhang damit steht die Frage, ob die Translokation in den Protomeren unabhängig voneinander erfolgt, was unbeeinflusst stattfindenden Efflux und Influx bedeuten könnte, oder ob im Pentamer die Translokationsporen in einem kooperativen Modus geöffnet bzw. geschlossen werden. In der Literatur gibt es diesbezüglich verschiedene Standpunkte, welche sich vor allem aus den elektrophysiologischen Untersuchungen der FNT-abhängigen Translokation ableiten, bei denen Ionenströme in einzelnen Kanälen gemessen wurden. Für *StFocA* wurden bis zu fünf verschiedene Zustände des Ionenstroms pro Pentamer und starke Permeabilitätsunterschied in Abhängigkeit vom pH-Wert detektiert, was die Arbeitsgruppe um O. Einsle und S. Andrade als Indikator für Kooperativität zwischen den Protomeren auffasste (Lü *et al.*, 2012a). Hingegen wurde aus den Studien mit *StNirC* geschlossen, dass keine Kooperativität bei der Translokation der einzelnen Protomere vorliegt, da kaum Pentamer-Spezies gefunden wurden, in welchen alle Protomere des Pentamers eine „offene“ oder „geschlossene“ Konformation hatten (Lü *et al.*, 2012b).

Die zweite Option, welche ausschließt, dass FocA ein „Ionen-Kanal-Transporter-Hybrid“ ist, könnte sein, dass es in *E. coli* zwei verschiedene FocA-Populationen gibt. Zum einen würden einige Zellen FocA-Kanäle mit ausschließlich Efflux-Funktion aufweisen und zum anderen gäbe es eine Population, die für die Formiat-Aufnahme und FHL-abhängige Disproportionierung zu CO₂ und H₂ sorgt (Metcalf *et al.*, 2022). Dieses Modell mit heterogenen FocA-Spezies ist in bakteriellen Organismen nicht ungewöhnlich und wird als „*stochastic phenotype switching*“ bezeichnet, das heißt, dass je nach Umgebung bzw. Lebensbedingungen könnte eine phenotypische Anpassung erfolgen (Rainey *et al.*, 2011).

Beide Modelle sind sehr schlüssig, aber unter der Annahme, dass die Translokation von FocA nicht kooperativ erfolgt, könnte das Modell, dass FocA ein „Ionen-Kanal-Transporter-Hybrid“ ist, favorisiert werden. Die These sollte jedoch dahingehend spezifiziert werden, dass es im FNT Pentamer sowohl Protomere gibt, in welchen der Efflux der namensgebenden Ionen mit jeweils einem Proton nach Kanal-artigem Mechanismus stattfindet, als auch Protomere, die den Import der Ionen wie ein sekundär aktiver Transporter gewährleisten. Beide Translokationsprozesse können dann unabhängig und auch parallel zueinander stattfinden.

3.4 Bedeutung der FNT-Forschung und Ausblick

Allgemein liefert die Forschung an FNTs bedeutsame Erkenntnisse nicht nur im Verständnis der spezifischen Ionen-Translokation, sondern da sie in der Regel weitreichendere regulatorische Funktion im anaeroben Stoffwechsels der Mikroorganismen haben (vgl. Abschnitt 3.1), können auch Aussagen beispielsweise zu komplexeren Zusammenhängen wie der Energiekonservierung abgeleitet werden.

Darüber hinaus kann die FNT-Forschung und im Speziellen am Formiat-Kanal FocA, der sowohl Kanal- bzw. Transporter-Charakteristika aufweist (siehe Abschnitt 3.3), auch entwicklungs-genetisch einen wichtigen Beitrag für die Grundlagenforschung leisten. Die FNTs sind evolutionär gesehen sehr alte Proteine, da kleine organische Moleküle wie beispielsweise Formiat und Acetat erdgeschichtlich gesehen schon sehr früh vorhanden waren und die Mikroorganismen ihren Stoffwechsel darauf optimierten, sodass diese Verbindungen für die Energiekonservierung genutzt werden konnten. Aufgrund des dualen Translokationscharakters dienten sie möglicherweise als Ausgangspunkt für eine konvergente Evolution, aus der andere mögliche Kanal- bzw. Transportproteine durch „*loss of function*“ resultierten. Eine solche Vereinfachung eines ursprünglichen „Ionen-Kanal-Transporter-Hybrids“ wäre vorstellbar, da einige FNTs aus rein physiologischen Sichtweise nicht gezwungenermaßen bidirektional funktionieren müssen und so je nach metabolischen Voraussetzungen ein Kanal oder ein sekundär aktiver Transporter die Translokation übernehmen könnte.

Wie im Abschnitt 1.3.1 beschrieben, findet man FNTs nicht in höheren Eukaryoten, jedoch in einigen Pathogenen bzw. Parasiten; so beispielsweise den Nitrit-transportierenden Kanal NirC in *S. enterica*, den Lactat-Transporter in *P. falciparum* oder auch andere Vertreter der FNTs in Pilzen wie verschiedenen *Aspergillus* und *Candida* Spezies. Eine Strategie diese Organismen selektiv zu bekämpfen, ist es, die FNTs als Angriffspunkt zu nutzen, da der befallene Wirt/Empfänger nicht geschädigt werden kann. Ein besseres Verständnis der Translokationsmechanismen könnte es daher ermöglichen die FNTs mit speziellen Molekülen so zu inhibieren, dass der Metabolismus der Mikroorganismen und deren Pathogenität gestört ist. Am Beispiel der Malaria-Krankheit lässt sich die Bedeutung der FNT-Forschung besonders gut erkennen. Malaria wird durch *Plasmodium*-Spezies hervorgerufen, die durch den Stich der *Anopheles* Mücke übertragen werden und forderte laut Weltgesundheitsorganisation im Jahr 2020 schätzungsweise 627.000 Tote (WHO, abgerufen 2022). Die Mikroorganismen produzieren ausgehend von Glukose ATP, Protonen und sehr viel Lactat, welches *via PfFNT* aus dem Cytoplasma geschleust wird (Wu *et al.*, 2015). Um den parasitären Energiestoffwechsel zu blockieren, werden seit vielen Jahren Inhibitoren mit *PfFNT* als Wirkort gesucht. Bereits bekannte Malariamittel schließen Phloretin, Furosemid und Zimtsäurederivate, deren mittlere inhibitorische Konzentration im millimolaren Bereich liegen, ein, aber es wurde auch das in nanomolarer Konzentration wirksame Pentafluoro-3-hydroxypent-2-en-1-on identifiziert (Cranmer *et al.*, 1995; Elliott *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2015; Marchetti *et al.*, 2015; Walloch *et al.*, 2021).

An den letzten Punkt angelehnt, könnten detailliertere Erkenntnisse insbesondere in Hinblick auf die Differenzierung der Mechanismen von Ionen-Kanälen bzw. Pumpen eine zentrale Rolle in der bewussten genetischen und biochemischen Modifikation von Membranproteinen spielen. Dies ermöglicht die gezielte Beeinflussung von Transportraten bzw. Molekülselektivitäten. Es wurden bereits

verschiedene pharmakologische Manipulationen für Ionen-translozierenden Proteine angewendet. Mittels Palytoxin konnte der sekundär aktive Transporter $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in einen Kanal mit geringerer Selektivität, aber stark erhöhter Ionen-Transportrate umgewandelt werden (Artigas und Gadsby, 2004).

Auch das biotechnologische Anwendungspotential von Ionen-Kanälen/Transportern sollte nicht unterschätzt werden. So wurden im Rahmen dieser Promotionsarbeit ein *E. coli* Stamm mit wahrscheinlich biotechnologischer Bedeutung generiert. MC4200 codiert für einen ausschließlich unidirektional funktionierenden Formiat-Kanal; das heißt, dass das intrazellulär produzierte Formiat sehr effizient und ohne Reimport aus dem Organismus transportiert wird (Kammel *et al.*, 2022a). Da die Modifikation auf genomischer Ebene eingebracht wurde (Austausch des Codons 209 im *focA* Gen; siehe Kammel *et al.*, 2022a), ist die Mutation stabil und die Handhabung dieser *E. coli* Zellen sehr simpel. Weil die Formiat-Produktion nur anaerob erfolgen kann, ist der Anspruch an Bioreaktoren für die Kultivierung vergleichsweise gering. Man benötigt jedoch ein gut gepuffertes Kulturmedium, um die Ansäuerung durch die Reaktionen der gemischten Säuregärung zu kompensieren, und wenn die Zuckerquelle, ständig zugeführt wird, können die Zellen zu relativ hohen Zelldichten wachsen und exportieren dabei Formiat in den Kulturüberstand. Erste Versuche zur Optimierung der Ausbeute konnten mit einer MC4200 *ldhA*-Mutante, die unter verbesserten Bedingungen (Glukose-Konzentration, Einstellen des pHs und Pufferkapazität des Mediums, etc.) kultiviert wurde, im Vergleich zu DH4200 unter standardisierten Kultivierungsbedingungen aus Kammel *et al.*, 2022a bereits eine ca. vierfache Erhöhung der Formiat-Konzentration bewirken (unpublizierte Ergebnisse M. Kammel und G. Sawers). Die Anpassung weiterer Parameter der Kultivierung mit einer kostengünstigeren Kohlenstoffquelle und Verwendung einer *ppc*-Mutante, bei welcher durch die fehlende Phosphoenolpyruvat-Carboxylase ein weiterer Zweig der gemischten Säuregärung inhibiert wird (vgl. Reaktionen der gemischten Säuregärung in Abb 1), könnten die Konzentration im Kulturüberstand weiter erhöhen. Unter der Voraussetzung, dass eine geeignete Methode zur Isolierung des Formiat bzw. der Ameisensäure zur Verfügung steht, könnte diese(s) als möglicher Energieträger genutzt werden. Das Potenzial der Ameisensäure als sehr umweltfreundlicher Energiespeicher konnte bereits gezeigt werden. So erlangte ein Studentenprojekt an der Universität Eindhoven in den Niederlanden große Aufmerksamkeit, da in dessen Rahmen der erste Bus mit Ameisensäure als Antrieb entwickelt wurde. Die Ameisensäure wird dabei zum Kraftstoff Hydrozin umgewandelt, was in H_2 und CO_2 gespalten wird und dabei bis zu 25 kW produzieren konnte (Tiemessen, 2017).

In den vorherigen Abschnitten wurde bereits die Wichtigkeit der FNT-Forschung und auch das Anwendungspotential dieser aufgeschlüsselt. Jedoch ergeben sich viele zentralen Fragen, die bisher noch nicht im Detail oder in Bezug auf das *in vivo*-System geklärt werden konnten.

(1) Obwohl die Interaktion zwischen FocA und PflB durch verschiedene *in vitro* und *in vivo* Methoden nachgewiesen wurde und ein Modell des FocA-PflB-Komplexes erstellt wurde, sind die mechanistischen Details des *gatings* nicht geklärt (Doberenz *et al.*, 2014). Neue Strukturinformationen könnten diesbezüglich Aufschluss geben. Es wäre daher sehr interessant, eine Struktur des Proteinkomplexes, welche beispielsweise durch Cryo-EM aufgelöst werden könnte, zu analysieren und diese mit der bereits vorliegenden Struktur aus der Kooperation mit *P. Kastriis* gegenüberzustellen. Sowohl diese Cryo-EM-Struktur und die mittels Röntgenkristallographie bestimmte *EcFocA*-Struktur zeigen FocA in der

„geschlossenen“ Konformation, das heißt, dass T91 und H209 nicht miteinander über eine Wasserstoffbrücke interagieren, die Ω -Schleufe in der „unten“-Position ist und die Konstriktionsstellen zu eng für die Passage von Formiat-Ionen sind (unveröffentlichte Daten in Zusammenarbeit mit der Gruppe um P. Kastiris; PDB: 3KCU von Wang *et al.*, 2009). Idealerweise könnte im FocA-PflB-Komplex die „offene“ Konformation visualisiert werden, mit den unterschiedlichen Protomeren von VcFocA bzw. StFocA verglichen werden, woraus weitere mechanistische Details abgeleitet werden könnten.

(2) Desweiteren stellt sich die Frage, ob die FocA-abhängige Formiat-Translokation ausschließlich durch die Interaktion mit PflB reguliert wird, oder auch weitere mutmaßlich periplasmatisch lokalisierte Proteine involviert sind. Da der Formiat-Importer FdhC sehr wahrscheinlich durch FDHs reguliert wird, ist auch für FocA eine Wechselwirkung mit diesen Proteinen zu vermuten. Erste Hinweise darauf lieferten Untersuchungen mit *selC*-Mutanten, welche u.a. die Selenocystein-haltigen FDHs nicht synthetisieren, und welche Parentalstamm-artigen Formiat-Efflux, aber Defizite im Import aufwiesen (Beyer *et al.*, 2013). Da eine *selC*-Mutante neben weiteren Proteinen auch kein aktives FDH-H (Teil des FHL-1-Komplexes) ausbildet, kann dieser Phänotyp nicht nur auf das Fehlen der periplasmatischen Dehydrogenasen zurückgeführt werden. Die Erstellung einer *fdo fdn*-Doppelmutante, in welcher weder FDH-O noch FDH-N synthetisiert werden, könnte eindeutig Auskunft darüber geben, ob die Formiat-Translokation und dessen Bidirektionalität von diesen Enzymen direkt beeinflusst wird.

(3) Zudem wäre es aufschlussreich, die Wechselwirkung von FocA und dem FHL-1-Komplex intensiver zu untersuchen. Da nicht unwahrscheinlich ist, dass das Vorhandensein von FHL-1 die Formiat-Aufnahme *via* FocA fördert, was direkt in Zusammenhang mit der Formiat und FhIA-abhängigen Synthese des Komplexes steht, scheint die Interaktion ein komplexes Wirkungsgefüge zu sein. *In vivo* Formiat-Translokations-Versuche auch unter Zugabe von Protonophoren und mit verschiedenen *focA* und *hyc*-Mutanten, ähnlich der Publikation Telleria Marloth und Pinske, 2020, könnten diesbezüglich aussagekräftig sein. Zusätzlich sollte die These, dass der FHL-Komplex Formiat-Ionen und Protonen translozieren kann, mit verschiedenen *focA hyc*-Kombinationsmutanten untersucht werden.

(4) Aus den Daten dieser Promotion konnten bereits Funktionen von T91 und H209 und deren Interaktion über eine Wasserstoffbrückenbindung in der FocA-abhängigen Translokation abgeleitet werden. Für zukünftige Experimente wäre es sehr interessant, eine Doppelvariante zu erstellen, in welcher die Aminosäuren an Position 91 und 209 durch eine Salzbrücke permanent interagieren, was in der Fixierung der Position der Aminosäure 91 und damit auch der Ω -Schleufe resultieren würde. Damit könnte eine zusätzliche Bestätigung geliefert werden, dass konformationelle Veränderungen für den Translokationsmechanismus und generell ein fein-reguliertes Öffnen und Schließen der Pore in Reaktion auf den Metabolismus des Organismus wichtig sind. Folgende Varianten wären zur Analyse der Formiat-Translokation bzw. Hypophosphit-Aufnahme geeignet FocA_{T91D H209K} bzw. FocA_{T91K H209D}.

(5) Außerdem wurde die Relevanz der Histidin-vermittelten Protonierung des Anions bei dessen Import gezeigt, dennoch gibt es noch experimentelle Ansätze, die dies zusätzlich bestätigen könnten. Da die Hypophosphit-Sensitivitäts-Analysen bezüglich des Import-Mechanismus sehr aussagekräftig waren, könnten weitere Formiat-ähnlichen Molekülen getestet werden. Dies ist ein gutes Mittel, um zu differenzieren, ob Protonierungen in der Translokationspore erfolgen können/müssen. Es wäre daher

interessant zu testen, wie sich eine *focA*-Mutante bzw. verschiedene FocA-Varianten, welche die *focA*-Mutante komplementieren, bezüglich der Translokation von Formamid verhalten. Das Amid der Ameisensäure liegt unter physiologischen Bedingungen als neutrale Spezies vor, daher muss es bei der Translokation nicht protoniert werden. Inwiefern es *via* FocA in die Zelle aufgenommen wird und ob dafür die mechanistisch relevanten Aminosäuren T91 und H209 eine Rolle spielen, sollte daher experimentell untersucht werden.

(6) Wie bereits geschildert, konnte für den Formiat-Efflux experimentell bestätigt werden, dass neben Formiat Protonen *via* FocA ins Periplasma transloziert wurden (unveröffentlichte Daten von L. Vanyan und K. Trchounian). Eine eindeutige Verifizierung, ob Formiat im Symport mit Protonen ins Cytoplasma importiert wird, steht noch aus und könnte ebenfalls durch Messungen von Protonen-Translokation in An- und Abwesenheit von Protonophoren erfolgen (vgl. 3.3.5; Methoden der Experimente von L. Vanyan und K. Trchounian). Zur Analyse der H⁺-Co-Translokation könnten pH-sensitive Farbstoffe (wie Acridinorange; vgl. Rosen, 1986) verwendet werden. Vollständige Kohlenstoffbilanzen bzw. Markierungsexperimente (wie in Metcalfe *et al.* 2022), welche verschiedene Untersuchungen in *focA* und *pflB*-Mutanten einschließen sollten, könnten zudem die bisher teilweise nur qualitativen Ergebnisse zur Formiat-Translokation vervollständigen bzw. für eine bessere Quantifizierung sorgen.

(7) Da sich die Transportraten bei Kanälen oder Transportern um mehrere Größenordnungen unterscheiden, könnten elektrophysiologische Messungen, in welchen zumindest PflB als Interaktionspartner präsent ist, die Geschwindigkeit des Transportes besser auflösen und eine Zuordnung zu Kanälen bzw. Transportern oder als Hybrid unterstützen. Auch wenn das *in vivo* Analyse-System viele Rückschlüsse auf die Translokationsaktivität von Varianten zulässt, können kinetische Parameter oder der quantitative Flux am einfachsten in *in vitro* Systemen bestimmt werden. Dafür würden sich beispielsweise Studien mit „*right-side-out*“ bzw. „*right-side-in*“ Membranvesikeln, in welchen auch PflB als Interaktionspartner vorhanden ist, eignen.

Zusätzlich ergeben sich für den *E. coli* Formiat-Stoffwechsel und FNTs weitere ungeklärte Thematiken:

(8) Noch offen ist die Frage, ob es neben FocA noch weitere Formiat-translozierende Proteine in *E. coli* gibt. Eine Option wäre das *Screening* einer umfassenderen Mutanten-Bibliothek, welche beispielsweise durch Transposon-abhängige Mutagenese erstellt werden könnte, mittels einer Hypophosphit-Sensitivitäts-Analyse (vgl. Suppmann und Sawers, 1994). Alternativ können auch in deutlich gerichteteren Experimenten ausgehend von Proteinen des Formiat-Stoffwechsels nach Interaktionspartnern gesucht werden. *In vivo* Vernetzungsstudien über anschließende massenspektrometrische Untersuchungen könnten dazu beitragen, neue Formiat-translozierende Proteine zu identifizieren.

(9) Nachdem bisher hauptsächlich der Translokationsmechanismus von FocA im Fokus stand, sollte die Übertragbarkeit dessen auf andere Mitglieder der FNT-Familie geprüft werden. Als erster Schritt wäre eine Etablierung von Nitrit/Hydrosulfid-sensitiven Reporter-Systemen vorstellbar. Dies ist relevant, da bei diesen Proteinen Aussagen zur Aktivität vor allem auf Strukturdaten und elektrophysiologischen Messungen beruhen, bei denen die Interaktionspartner (Nitrit- und Sulfitreduktasen) keine Berücksichtigung fanden. So könnte differenzierter untersucht werden, ob sich die Translokationsmechanismen anderer FNTs gleichen.

4 Zusammenfassung

Die wichtigsten neuen Erkenntnisse, welche in den drei Kapiteln der Doktorarbeit präsentiert wurden, sind nachfolgend zusammengefasst. Folgende Aussagen sind für den Formiat-Kanal FocA in *E. coli* gültig, aber vermutlich auch auf andere Vertreter der Formiat-Nitrit-Transporter Familie übertragbar.

(1) Sowohl der Formiat/(H⁺)-Efflux, als auch dessen Influx sind von der Interaktion der Pyruvat Formiat-Lyase mit dem N-Terminus des Formiat-Kanals FocA abhängig. Determinanten für die Wechselwirkungen mit PflB sind die α -helikale Struktur des N-Terminus und spezielle Sequenzmotive (u.a. D4-N5-P6).

(2) Histidin 209 ist essentiell für den Aufnahme-Mechanismus. Einige FocA_{H209}-Substitutionsvarianten (H209A/I/T/N/Q) wiesen ausschließlich Formiat-Effluxaktivität auf. Desweiteren konnte für keine alternative Aminosäure an dieser Position FocA-abhängige Hypophosphit-Aufnahme festgestellt werden, sodass sich für den Import-Mechanismus die Bedeutung von Histidin in der Protonierung der zu translozierenden Ionen ableiten lässt.

(3) Die Hydroxyl-Funktion der Aminosäure 91 (in *EcFocA* T91) ist notwendig für eine kontrollierte bidirektionale FocA-abhängige Formiat-Translokation. FocA_{T91}-Austauschvarianten sorgten für die intrazelluläre Akkumulation von Formiat und ein Defizit in der Hypophosphit-Aufnahme.

(4) Die Interaktion von H209 und T91 über Wasserstoffbrückenbindung ist wesentlich für die Formiat-Translokation.

Daraus wurden folgende Hypothesen zum Formiat-Translokationsmechanismus von FocA abgeleitet:

A) Der Formiat-Efflux, welcher von Protonen-Co-Translokation begleitet ist, erfolgt nach Kanal-artigem Mechanismus. Die Translokation wird initiiert durch Interaktion vom FocA N-Terminus mit dem Formiat-produzierenden Enzym PflB und zudem wird die Pore durch konformationelle Änderungen erweitert.

B) Die Aufnahme von zuvor exportiertem Formiat zusammen mit Protonen wird durch sekundär aktiven Transport gewährleistet. Bei der Passage des Anions durch die Translokationspore wird dieses durch das Imidazol-Kation von H209 protoniert. H209 und T91 interagieren über eine Wasserstoffbrückenbindung. Ameisensäure kann den zentralen hydrophoben Teil der Pore überwinden. Konformationelle Änderungen im Protein geben die cytoplasmatische Konstriktion frei, sodass die Säure passieren kann, dabei überträgt sie ein Proton auf das T91. Dies trägt formell zur Ladungstrennung und damit Energiekonservierung bei.

C) Liegt Formiat im Periplasma in höheren Konzentrationen vor, so gibt es einen alternativen Mechanismus, welcher vermeintlich auch eher mit Kanal-artiger Translokation vergleichbar ist, und mit welchem die Ameisensäure in die Zelle aufgenommen wird und möglichst effizient vom FHL-1-Komplex umgesetzt wird.

D) FocA ist somit weder als klassischer Ionen-Kanal noch als Transporter einzuordnen, sondern ist ein „Ionen-Kanal-Transporter-Hybrid“.

5 Literaturverzeichnis

- Andorfer MC, Backman LRF, Li PL, Ulrich EC, Drennan CL. Rescuing activity of oxygen-damaged pyruvate formate-lyase by a spare part protein. *J Biol Chem*. 2021; 297(6):101423.
- Andrews SC, Berks BC, McClay J, et al. A 12-cistron *Escherichia coli* operon (*hyf*) encoding a putative proton-translocating formate hydrogenlyase system. *Microbiology (Reading)*. 1997; 143(11):3633-3647.
- Artigas P, Gadsby DC. Large diameter of palytoxin-induced Na/K pump channels and modulation of palytoxin interaction by Na/K pump ligands. *J Gen Physiol*. 2004; 123(4):357-376.
- Atkovska K, Hub JS. Energetics and mechanism of anion permeation across formate-nitrite transporters. *Sci Rep*. 2017; 7(1):12027.
- Axley MJ, Grahame DA, Stadtman TC. *Escherichia coli* formate-hydrogen lyase. Purification and properties of the selenium-dependent formate dehydrogenase component. *J Biol Chem*. 1990; 265(30):18213-18218.
- Babu M, Greenblatt JF, Emili A, Strynadka NC, Reithmeier RA, Moraes TF. Structure of a SLC26 anion transporter STAS domain in complex with acyl carrier protein: implications for *E. coli* YchM in fatty acid metabolism. *Structure*. 2010; 18(11):1450-1462.
- Becker A, Fritz-Wolf K, Kabsch W, Knappe J, Schultz S, Volker Wagner AF. Structure and mechanism of the glycol radical enzyme pyruvate formate-lyase. *Nat Struct Biol*. 1999; 6(10):969-75.
- Becker A, Kabsch W. X-ray structure of pyruvate formate-lyase in complex with pyruvate and CoA. How the enzyme uses the Cys-418 thiyl radical for pyruvate cleavage. *J Biol Chem*. 2002; 277(42):40036-42.
- Begg, YA, Whyte, JN, Haddock, BA. The identification of mutants of *Escherichia coli* deficient in formate dehydrogenase and nitrate reductase activities using dye indicator plates. *FEMS Microbiol Lett*. 1977; 2:47-50.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Stryer Biochemistry*. London, UK: MacMillan, 7th Edition; 2012.
- Beyer L, Doberenz C, Falke D, Hunger D, Suppmann B, Sawers RG. Coordination of FocA and pyruvate formate-lyase synthesis in *Escherichia coli* demonstrates preferential translocation of formate over other mixed-acid fermentation products. *J Bacteriol*. 2013; 195(7):1428-1435.
- Beyer L. Physiologische Charakterisierung des Formiat-Stoffwechsels in *Escherichia coli*, Doktorarbeit, Institut für Mikrobiologie, MLU Halle, 2014
- Birkmann A, Böck A. Characterization of a cis regulatory DNA element necessary for formate induction of the formate dehydrogenase gene (*fdhF*) of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 1989; 3(2):187-195.
- Birkmann A, Zinoni F, Sawers G, Böck A. Factors affecting transcriptional regulation of the formate-hydrogen-lyase pathway of *Escherichia coli*. *Arch Microbiol*. 1987; 148(1):44-51.
- Böhm R, Sauter M, Böck A. Nucleotide sequence and expression of an operon in *Escherichia coli* coding for formate hydrogenlyase components. *Mol Microbiol*. 1990; 4(2):231-243.
- Bowman SEJ, Backman LRF, Bjork RE, et al. Solution structure and biochemical characterization of a spare part protein that restores activity to an oxygen-damaged glycol radical enzyme. *J Biol Inorg Chem*. 2019 ;24(6):817-829.
- Brush EJ, Lipsett KA, Kozarich JW. Inactivation of *Escherichia coli* pyruvate formate-lyase by hypophosphite: evidence for a rate-limiting phosphorus-hydrogen bond cleavage. *Biochemistry*. 1988; 27(6):2217-2222.
- Casadaban MJ. Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol*. 1976; 104(3):541-555.
- Casal M, Cardoso H, Leao C. Mechanisms regulating the transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology (Reading)*. 1996; 142(6):1385-1390.
- Clegg S, Yu F, Griffiths L, Cole JA. The roles of the polytopic membrane proteins NarK, NarU and NirC in *Escherichia coli* K-12: two nitrate and three nitrite transporters. *Mol Microbiol*. 2002; 44(1):143-155.

- Craciun S, Balskus EP. Microbial conversion of choline to trimethylamine requires a glycy radical enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(52):21307-21312.
- Crain AV, Broderick JB. Pyruvate formate-lyase and its activation by pyruvate formate-lyase activating enzyme. *J Biol Chem*. 2014; 289(9):5723-5729.
- Cranmer SL, Conant AR, Gutteridge WE, Halestrap AP. Characterization of the enhanced transport of L- and D-lactate into human red blood cells infected with *Plasmodium falciparum* suggests the presence of a novel saturable lactate proton cotransporter. *J Biol Chem*. 1995; 270(25):15045-15052.
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res*. 2004; 14(6):1188-1190.
- Czyzewski BK, Wang DN. Identification and characterization of a bacterial hydrosulphide ion channel. *Nature*. 2012; 483(7390):494-497.
- Doberenz C, Zorn M, Falke D, Hunger D, Beyer L, Ihling CH, Meiler J, Sinz A, Sawers RG. Pyruvate formate-lyase interacts directly with the formate channel FocA to regulate formate translocation. *J Mol Biol*. 2014; 426(15):2827-2839.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Quo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*. 1998; 280(5360):69-77.
- Drummond M, Whitty P, Wootton J. Sequence and domain relationships of *ntrC* and *nifA* from *Klebsiella pneumoniae*: homologies to other regulatory proteins. *EMBO J*. 1986; 5(2):441-447.
- Dutzler R, Campbell EB, MacKinnon R. Gating the selectivity filter in Cl⁻ chloride channels. *Science*. 2003; 300(5616):108-112.
- Eisenman G, Horn R. Ionic selectivity revisited: the role of kinetic and equilibrium processes in ion permeation through channels. *J Membr Biol*. 1983; 76(3):197-225.
- Elliott JL, Saliba KJ, Kirk K. Transport of lactate and pyruvate in the intraerythrocytic malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Biochem J*. 2001; 355(3):733-739.
- Enoch HG, Lester RL. The purification and properties of formate dehydrogenase and nitrate reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 1975; 250(17):6693-6705.
- Falke D, Doberenz C, Hunger D, Sawers RG. The glycy radical enzyme 2-ketobutyrate formate-lyase, TdcE, interacts specifically with the formate-translocating FNT-channel protein FocA. *Biochem Biophys Rep*. 2016; 6:185-189.
- Falke D, Schulz K, Doberenz C, Beyer L, Lilie H, Thiemer B, Sawers RG. 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*. 2010; 303(1):69-75.
- Feng Z, Hou T, Li Y. Concerted movement in pH-dependent gating of FocA from molecular dynamics simulations. *J Chem Inf Model*. 2012; 52(8):2119-2131.
- Finney AJ, Lowden R, Fleszar M, Albareda M, Coulthurst SJ, Sargent F. The plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum* contains a functional formate hydrogenlyase-2 complex. *Mol Microbiol*. 2019; 112(5):1440-1452.
- Frey M, Rothe M, Wagner AF, Knappe J. Adenosylmethionine-dependent synthesis of the glycy radical in pyruvate formate-lyase by abstraction of the glycine C-2 pro-S hydrogen atom. Studies of [2H]glycine-substituted enzyme and peptides homologous to the glycine 734 site. *J Biol Chem*. 1994; 269(17):12432-7.
- Fu D, Libson A, Miercke LJ, Weitzman C, Nollert P, Krucinski J, Stroud RM. Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science*. 2000; 290(5491):481-486.
- Gomes AF, Gozzo FC. Chemical cross-linking with a diazirine photoactivatable cross-linker investigated by MALDI- and ESI-MS/MS. *J Mass Spectrom*. 2010; 45(8):892-899.
- Gonen T, Cheng Y, Sliz P, Hiroaki Y, Fujiyoshi Y, Harrison SC, Walz T. Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals. *Nature*. 2005; 438(7068):633-638.

- Hakobyan B, Pinske C, Sawers G, Trchounian A, Trchounian K. pH and a mixed carbon-substrate spectrum influence FocA- and FocB-dependent, formate-driven H₂ production in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 2018; 365(21):10.1093/femsle/fny233.
- Helmstetter F, Arnold P, Höger B, Petersen LM, Beitz E. Formate-nitrite transporters carrying nonprotonatable amide amino acids instead of a central histidine maintain pH-dependent transport. *J Biol Chem.* 2019; 294(2):623-631.
- Hersh BM, Farooq FT, Barstad DN, Blankenhorn DL, Slonczewski JL. A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1996; 178(13):3978-3981.
- Hesslinger C, Fairhurst SA, Sawers G. Novel keto acid formate-lyase and propionate kinase enzymes are components of an anaerobic pathway in *Escherichia coli* that degrades L-threonine to propionate. *Mol Microbiol.* 1998; 27(2):477-492.
- Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol.* 1952; 116(4):424-448.
- Hopper S, Böck A. Effector-mediated stimulation of ATPase activity by the sigma 54-dependent transcriptional activator FHLA from *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1995; 177(10):2798-2803.
- Hopper S, Korsá I, Böck A. The nucleotide concentration determines the specificity of *in vitro* transcription activation by the sigma 54-dependent activator FhIA. *J Bacteriol.* 1996; 178(1):199-203.
- Huerta-Cepas J, Szklarczyk D, Heller D, et al. eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47(1):309-314.
- Hunger D, Doberenz C, Sawers RG. Identification of key residues in the formate channel FocA that control import and export of formate. *Biol Chem.* 2014; 395(7-8):813-825.
- Hunger D, Röcker M, Falke D, Lilie H, Sawers RG. The C-terminal Six Amino Acids of the FNT Channel FocA Are Required for Formate Translocation But Not Homopentamer Integrity. *Front Microbiol.* 2017; 8:1616.
- Ingledeu WJ, Poole RK. The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* 1984; 48(3):222-271.
- Javelle A, Lupo D, Zheng L, Li XD, Winkler FK, Merrick M. An unusual twin-his arrangement in the pore of ammonia channels is essential for substrate conductance. *J Biol Chem.* 2006; 281(51):39492-39498.
- Jormakka M, Törnroth S, Byrne B, Iwata S. Molecular basis of proton motive force generation: structure of formate dehydrogenase-N. *Science.* 2002; 295(5561):1863-1868.
- Kammel M, Hunger D, Sawers RG. The soluble cytoplasmic N-terminal domain of the FocA channel gates bidirectional formate translocation. *Mol Microbiol.* 2021; 115(4):758-773.
- Kammel M, Sawers RG. The FocA channel functions to maintain intracellular formate homeostasis during *Escherichia coli* fermentation. *Microbiology (Reading)*. 2022; 168(4):10.1099/mic.0.001168. (Kammel und Sawers, 2022a)
- Kammel M, Sawers RG. Distinguishing functional from structural roles of conserved pore residues during formate translocation by the FocA anion channel. *MicrobiologyOpen*. 2022; 11(4): e1312. (Kammel und Sawers, 2022b)
- Kammel M, Trebbin O, Pinske C, Sawers RG. A single amino acid exchange converts FocA into a unidirectional efflux channel for formate. *Microbiology (Reading)*. 2022; 168(1):001132. (Kammel *et al.*, 2022a)
- Kammel M, Trebbin O, Sawers RG. Interplay between the conserved pore residues Thr-91 and His-209 controls formate translocation through the FocA channel. *Microb Physiol.* 2022; 32(3-4):95-107. (Kammel *et al.*, 2022b)
- Khademi S, O'Connell J 3rd, Remis J, Robles-Colmenares Y, Miercke LJ, Stroud RM. Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. *Science.* 2004; 305(5690):1587-1594.
- Karinou E, Compton EL, Morel M, Javelle A. The *Escherichia coli* SLC26 homologue YchM (DauA) is a C(4)-dicarboxylic acid transporter. *Mol Microbiol.* 2013; 87(3):623-640.

- Knappe J, Blaschkowski HP, Gröbner P, Schmitt T. Pyruvate formate-lyase of *Escherichia coli*: the acetyl-enzyme intermediate. *Eur J Biochem.* 1974; 50(1):253-263.
- Knappe J, Neugebauer FA, Blaschkowski HP, Gänzler M. Post-translational activation introduces a free radical into pyruvate formate-lyase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984; 81(5):1332-1335.
- Knappe J, Sawers G. A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev.* 1990; 6(4):383-398.
- Külzer R, Pils T, Kappl R, Hüttermann J, Knappe J. Reconstitution and characterization of the polynuclear iron-sulfur cluster in pyruvate formate-lyase-activating enzyme. Molecular properties of the holoenzyme form. *J Biol Chem.* 1998; 273(9):4897-4903.
- Kundig W, Ghosh S, Roseman S. Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phosphor-transferase system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1964; 52(4):1067-1074.
- Latorre R, Miller C. Conduction and selectivity in potassium channels. *J Membr Biol.* 1983; 71(1-2):11-30.
- Leonhartsberger S, Ehrenreich A, Böck A. Analysis of the domain structure and the DNA binding site of the transcriptional activator FhIA. *Eur J Biochem.* 2000; 267(12):3672-3684.
- Leonhartsberger S, Korsia I, Böck A. The molecular biology of formate metabolism in enterobacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2002; 4(3):269-76.
- Li J, Stewart V. Localization of upstream sequence elements required for nitrate and anaerobic induction of *fdn* (formate dehydrogenase-N) operon expression in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 1992; 174(15):4935-4942.
- Lindenstrauß U, Pinske C. Dissection of the hydrogen metabolism of the enterobacterium *Trabulsiella guamensis*: Identification of a formate-dependent and essential formate hydrogenlyase complex exhibiting phylogenetic similarity to complex I. *J Bacteriol.* 2019; 201(12):e00160-19.
- Lindenstrauß U, Skorupa P, McDowall JS, Sargent F, Pinske C. The dual-function chaperone HycH improves assembly of the formate hydrogenlyase complex. *Biochem J.* 2017; 474(17):2937-2950.
- Neidhardt FC., Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, Umberger HE. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology.* Washington DC, USA: American Society for Microbiology, 2nd Edition; 1978.
- Loftus B, Anderson I, Davies R, et al. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature.* 2005; 433(7028):865-868.
- Lutz S, Jacobi A, Schlensog V, Böhm R, Sawers G, Böck A. Molecular characterization of an operon (*hyp*) necessary for the activity of the three hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 1991; 5(1):123-135.
- Lü W, Du J, Schwarzer NJ, Gerbig-Smentek E, Einsle O, Andrade SL. The formate channel FocA exports the products of mixed-acid fermentation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109(33):13254-13259. (Lü et al., 2012a)
- Lü W, Du J, Wacker T, Gerbig-Smentek E, Andrade SL, Einsle O. pH-dependent gating in a FocA formate channel. *Science.* 2011; 332(6027):352-354.
- Lü W, Schwarzer NJ, Du J, Gerbig-Smentek E, Andrade SL, Einsle O. Structural and functional characterization of the nitrite channel NirC from *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109(45):18395-18400. (Lü et al., 2012b)
- Lv X, Liu H, Ke M, Gong H. Exploring the pH-dependent substrate transport mechanism of FocA using molecular dynamics simulation. *Biophys J.* 2013; 105(12):2714-2723.
- Madeira F, Pearce M, Tivey ARN, et al. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* 2022; 50(W1):W276-W279.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Brock Mikrobiologie.* Berlin, DE: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 9. Ausgabe; 2001.

- Maier T, Binder U, Böck A. Analysis of the *hydA* locus of *Escherichia coli*: two genes (*hydN* and *hypF*) involved in formate and hydrogen metabolism. *Arch Microbiol.* 1996; 165(5):333-341.
- Marchetti RV, Lehane AM, Shafik SH, Winterberg M, Martin RE, Kirk K. A lactate and formate transporter in the intraerythrocytic malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun.* 2015; 6:6721.
- McDowall JS, Murphy BJ, Haumann M, Palmer T, Armstrong FA, Sargent F. Bacterial formate hydrogenlyase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111(38):E3948-E3956.
- Metcalfe GD, Sargent F, Hippler M. Hydrogen production in the presence of oxygen by *Escherichia coli* K-12. *Microbiology (Reading).* 2022;168(3):10.1099/mic.0.001167.
- Miller C. CIC chloride channels viewed through a transporter lens. *Nature.* 2006; 440(7083):484-489.
- Miller, JH. *Experiments in Molecular Genetics*. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory, 1972.
- Mnatsakanyan N, Bagramyan K, Trchounian A. Hydrogenase 3 but not hydrogenase 4 is major in hydrogen gas production by *Escherichia coli* formate hydrogenlyase at acidic pH and in the presence of external formate. *Cell Biochem Biophys.* 2004; 41(3):357-366.
- Müller MQ, Dreiocker F, Ihling CH, Schäfer M, Sinz A. Cleavable cross-linker for protein structure analysis: reliable identification of cross-linking products by tandem MS. *Anal Chem.* 2010; 82(16):6958-6968.
- Mulliez E, Ollagnier S, Fontecave M, Eliasson R, Reichard P. Formate is the hydrogen donor for the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(19):8759-8762.
- Mukherjee M, Vajpai M, Sankararamkrishnan R. Anion-selective Formate/nitrite transporters: taxonomic distribution, phylogenetic analysis and subfamily-specific conservation pattern in prokaryotes. *BMC Genomics.* 2017; 18(1):560.
- Nölling J, Reeve JN. Growth- and substrate-dependent transcription of the formate dehydrogenase (*fdhCAB*) operon in *Methanobacterium thermoformicum* Z-245. *J Bacteriol.* 1997; 179(3):899-908.
- Parast CV, Wong KK, Lewis SA, Kozarich JW, Peisach J, Magliozzo RS. Hydrogen exchange of the glycyl radical of pyruvate formate-lyase is catalyzed by cysteine 419. *Biochemistry.* 1995; 34(8):2393-9.
- Park JH, Saier MH Jr. Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins. *J Membr Biol.* 1996; 153(3):171-180.
- Peakman T, Crouzet J, Mayaux JF, et al. 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.* 1990; 191(2):315-323.
- Pecher A, Zinoni F, Jatisatienr C, Wirth R, Hennecke H, Böck A. On the redox control of synthesis of anaerobically induced enzymes in enterobacteriaceae. *Arch Microbiol.* 1983; 136(2):131-136.
- Peck HD, Gest H. Formic dehydrogenase and the hydrogenlyase enzyme complex in coli-aerogenes bacteria. *J Bacteriol.* 1957; 73(6):706-721.
- Peng Y, Veneziano SE, Gillispie GD, Broderick JB. Pyruvate formate-lyase, evidence for an open conformation favored in the presence of its activating enzyme. *J Biol Chem.* 2010; 285(35):27224-27231.
- Pinsent J. The need for selenite and molybdate in the formation of formic dehydrogenase by members of the coli-aerogenes group of bacteria. *Biochem J.* 1954; 57(1):10-16.
- Pinske C. The Ferredoxin-Like Proteins HydN and YsaA Enhance Redox Dye-Linked Activity of the Formate Dehydrogenase H Component of the Formate Hydrogenlyase Complex. *Front Microbiol.* 2018; 9:1238.
- Pinske C, Sawers RG. Anaerobic Formate and Hydrogen Metabolism. *EcoSal Plus.* 2016; 7(1):10.1128/ecosalplus.
- Plaga W, Frank R, Knappe J. Catalytic-site mapping of pyruvate formate lyase. Hypophosphite reaction on the acetyl-enzyme intermediate affords carbon-phosphorus bond synthesis (1-hydroxyethylphosphonate). *Eur J Biochem.* 1988; 178(2):445-450.

- Plesniak LA, Connelly GP, Wakarchuk WW, McIntosh LP. Characterization of a buried neutral histidine residue in *Bacillus circulans* xylanase: NMR assignments, pH titration, and hydrogen exchange. *Protein Sci.* 1996; 5(11):2319-2328.
- Pravda L, Sehnal D, Toušek D, et al. MOLEonline: a web-based tool for analyzing channels, tunnels and pores (2018 update). *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(W1):W368-W373.
- Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science.* 1992; 256(5055):385-387.
- Rainey PB, Beaumont HJ, Ferguson GC, Gallie J, Kost C, Libby E, Zhang XX. The evolutionary emergence of stochastic phenotype switching in bacteria. *Microb Cell Fact.* 2011; 10(Suppl 1):S14.
- Rödel W, Plaga W, Frank R, Knappe J. Primary structures of *Escherichia coli* pyruvate formate-lyase and pyruvate-formate-lyase-activating enzyme deduced from the DNA nucleotide sequences. *Eur J Biochem.* 1988; 177(1):153-158.
- Rosen BP. Ion extrusion systems in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 1986; 125:328-336.
- Rosentel JK, Healy F, Maupin-Furlow JA, Lee JH, Shanmugam KT. Molybdate and regulation of mod (molybdate transport), *fdhF*, and *hyc* (formate hydrogenlyase) operons in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1995; 177(17):4857-4864.
- Rossmann R, Maier T, Lottspeich F, Böck A. Characterisation of a protease from *Escherichia coli* involved in hydrogenase maturation. *Eur J Biochem.* 1995; 227(1-2):545-550.
- Rossmann R, Sawers G, Böck A. Mechanism of regulation of the formate-hydrogenlyase pathway by oxygen, nitrate, and pH: definition of the formate regulon. *Mol Microbiol.* 1991; 5(11):2807-2814.
- Rychkov GY, Pusch M, Roberts ML, Jentsch TJ, Bretag AH. Permeation and block of the skeletal muscle chloride channel, CIC-1, by foreign anions. *J Gen Physiol.* 1998; 111(5):653-665.
- Rycovska A, Hatahet L, Fendler K, Michel H. The nitrite transport protein NirC from *Salmonella typhimurium* is a nitrite/proton antiporter. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1818(5):1342-1350.
- Saier MH Jr, Eng BH, Fard S, et al. Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1422(1):1-56.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd Edition; 1989.
- Sankar P, Lee JH, Shanmugam KT. Gene-product relationships of *fhIA* and *fdv* genes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1988; 170(12):5440-5445.
- Sauter M, Böhm R, Böck A. Mutational analysis of the operon (*hyc*) determining hydrogenase 3 formation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 1992; 6(11):1523-1532.
- Sauter M, Sawers RG. Transcriptional analysis of the gene encoding pyruvate formate-lyase-activating enzyme of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 1990; 4(3):355-363.
- Savage DF, Egea PF, Robles-Colmenares Y, O'Connell JD 3rd, Stroud RM. Architecture and selectivity in aquaporins: 2.5 Å X-ray structure of aquaporin Z. *PLoS Biol.* 2003; 1(3):E72.
- Sawers G, Böck A. Anaerobic regulation of pyruvate formate-lyase from *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 1988; 170(11):5330-5336.
- Sawers G, Böck A. Novel transcriptional control of the pyruvate formate-lyase gene: upstream regulatory sequences and multiple promoters regulate anaerobic expression. *J Bacteriol.* 1989; 171(5):2485-2498.
- Sawers G, Heider J, Zehelein E, Böck A. Expression and operon structure of the *sel* genes of *Escherichia coli* and identification of a third selenium-containing formate dehydrogenase isoenzyme. *J Bacteriol.* 1991; 173:4983-4993.
- Sawers G, Hesslinger C, Müller N, Kaiser M. The glycyl radical enzyme TdcE can replace pyruvate formate-lyase in glucose fermentation. *J Bacteriol.* 1998; 180(14):3509-3516.
- Sawers G, Suppmann B. Anaerobic induction of pyruvate formate-lyase gene expression is mediated by the ArcA and FNR proteins. *J Bacteriol.* 1992; 174(11):3474-3478.

- Sawers G, Watson G. A glycyl radical solution: oxygen-dependent interconversion of pyruvate formate-lyase. *Mol Microbiol.* 1998; 29(4):945-954.
- Schlenzog V, Böck A. Identification and sequence analysis of the gene encoding the transcriptional activator of the formate hydrogenlyase system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 1990; 4(8):1319-1327.
- Schmidt JDR, Beitz E. Mutational widening of constrictions in a formate-nitrite/H⁺ transporter enables aquaporin-like water permeability and proton conductance. *J Biol Chem.* 2022; 298(1):101513.
- Self WT, Hasona A, Shanmugam KT. Expression and regulation of a silent operon, *hyf*, coding for hydrogenase 4 isoenzyme in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2004; 186(2):580-587.
- Sinnott M. *Comprehensive Biological Catalysis: A Mechanistic Reference*. London, UK: Academic Press; 1997.
- Skibinski DA, Golby P, Chang YS, Sargent F, Hoffman R, Harper R, Guest JR, Attwood MM, Berks BC, Andrews SC. Regulation of the hydrogenase-4 operon of *Escherichia coli* by the sigma(54)-dependent transcriptional activators FhIA and HyfR. *J Bacteriol.* 2002; 184(23):6642-6653.
- Slonczewski JL, Rosen BP, Alger JR, Macnab RM. pH homeostasis in *Escherichia coli*: measurement by ³¹P nuclear magnetic resonance of methylphosphonate and phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981; 78(10):6271-6275.
- Smart OS, Goodfellow JM, Wallace BA. The pore dimensions of gramicidin A. *Biophys J.* 1993; 65(6):2455-2460.
- Sokatch JR. *Bacterial Physiology and Metabolism*. London, UK: Kingdom Academic Press; 1969.
- Steinhilper R, Höff G, Heider H, Murphy BJ. Structure of the membrane-bound formate hydrogenlyase complex from *Escherichia coli*; bioRxiv 2022.03.21.484881.
- Stephenson M, Stickland LH. Hydrogenlyases: Bacterial enzymes liberating molecular hydrogen. *Biochem J.* 1932; 26(3):712-724.
- Sui H, Han BG, Lee JK, Walian P, Jap BK. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature.* 2001; 414(6866):872-878.
- Suppmann B. Genetische Untersuchungen zum Formiat-Transport in *Escherichia coli*, Doktorarbeit, Fakultät für Biologie, Universität München, 1993.
- Suppmann B, Sawers G. 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.* 1994; 11(5):965-982.
- Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49(D1):D605-D612.
- Telleria Marloth Y, Pinske C. Susceptibility of the formate hydrogenlyase reaction to the protonophore CCCP depends on the total hydrogenase composition. *Inorganics.*2020; 8(6),38.
- Tiemessen MM. Formic acid: a fuel for the next generation of busses?, Bachelorarbeit, Eindhoven University of Technology, Niederlande, 2017.
- Trchounian K, Poladyan A, Vassilian A, Trchounian A. Multiple and reversible hydrogenases for hydrogen production by *Escherichia coli*: dependence on fermentation substrate, pH and the F₀F₁-ATPase. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2012; 47(3):236-249.
- Trchounian A, Sawers R. Novel insights into the bioenergetics of mixed-acid fermentation: can hydrogen and proton cycles combine to help maintain a proton motive force?. *IUBMB Life.* 2014; 66(1):1-7.
- Trchounian K, Trchounian A. Hydrogen producing activity by *Escherichia coli* hydrogenase 4 (*hyf*) depends on glucose concentration. *International Journal of Hydrogen Energy.* 2014; 39:16914-16918.
- Trebbin O. Umwandlung eines bidirektionalen Kanals in einen unidirektionalen Kanal: Untersuchungen des Translokationsmechanismus des Formiatkanals FocA aus *Escherichia coli*, Masterarbeit, Institut für Mikrobiologie, MLU Halle, 2019.

- Uden G, Dünwald P. The Aerobic and Anaerobic Respiratory Chain of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*: Enzymes and Energetics. *EcoSal Plus*. 2008; 3(1):10.1128/ecosalplus.3.2.2.
- UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res*. 2021; 49(D1):D480-D489.
- Unkrig V, Neugebauer FA, Knappe J. The free radical of pyruvate formate-lyase. Characterization by EPR spectroscopy and involvement in catalysis as studied with the substrate-analogue hypophosphite. *Eur J Biochem*. 1989; 184(3):723-8.
- Vanyan L, Trchounian K. HyfF subunit of hydrogenase 4 is crucial for regulating F_0F_1 dependent proton/potassium fluxes during fermentation of various concentrations of glucose. *J Bioenerg Biomembr*. 2022; 54(2):69-79.
- Wagner AF, Frey M, Neugebauer FA, Schäfer W, Knappe J. The free radical in pyruvate formate-lyase is located on glycine-734. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89(3):996-1000.
- Waight AB, Czyzewski BK, Wang DN. Ion selectivity and gating mechanisms of FNT channels. *Curr Opin Struct Biol*. 2013; 23(4):499-506.
- Waight AB, Love J, Wang DN. Structure and mechanism of a pentameric formate channel. *Nat Struct Mol Biol*. 2010; 17(1):31-37.
- Walloch P, Hansen C, Priegann T, Schade D, Beitz E. Pentafluoro-3-hydroxy-pent-2-en-1-ones Potently Inhibit FNT-Type Lactate Transporters from all Five Human-Pathogenic *Plasmodium* Species. *ChemMedChem*. 2021; 16(8):1283-1289.
- Wang Y, Huang Y, Wang J, Cheng C, Huang W, Lu P, Xu YN, Wang P, Yan N, Shi Y. Structure of the formate transporter FocA reveals a pentameric aquaporin-like channel. *Nature*. 2009; 462(7272):467-472.
- Wanner BL, Kodaira R, Neidhardt FC. Regulation of *lac* operon expression: reappraisal of the theory of catabolite repression. *J Bacteriol*. 1978; 136(3):947-954.
- White WB, Ferry JG. Identification of formate dehydrogenase-specific mRNA species and nucleotide sequence of the *fdhC* gene of *Methanobacterium formicicum*. *J Bacteriol*. 1992; 174(15):4997-5004.
- Weltgesundheitsorganisation (WHO) Internet-Seite: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>, abgerufen 06.07.2022, 14:23 Uhr.
- Wiechert M, Beitz E. Mechanism of formate-nitrite transporters by dielectric shift of substrate acidity. *EMBO J*. 2017; 36(7):949-958.
- Wiechert M, Erler H, Gollmack A, Beitz E. A widened substrate selectivity filter of eukaryotic formate-nitrite transporters enables high-level lactate conductance. *FEBS J*. 2017; 284(16):2663-2673.
- Williamson G, Brito AS, Bizior A, Tamburrino G, Dias Mirandela G, Harris T, Hoskisson PA, Zachariae U, Marini AM, Boeckstaens M, Javelle A. Coexistence of Ammonium Transporter and Channel Mechanisms in Amt-Mep-Rh Twin-His Variants Impairs the Filamentation Signaling Capacity of Fungal Mep2 Transceptors. *mBio*. 2022;13(2):e0291321.
- Wu B, Rambow J, Bock S, Holm-Bertelsen J, Wiechert M, Soares AB, Spielmann T, Beitz E. Identity of a *Plasmodium* lactate/H(+) symporter structurally unrelated to human transporters. *Nat Commun*. 2015; 6:6284.
- Zhou MM, Davis JP, Van Etten RL. Identification and pKa determination of the histidine residues of human low-molecular-weight phosphotyrosyl protein phosphatases: a convenient approach using an MLEV-17 spectral editing scheme. *Biochemistry*. 1993; 32(33):8479-8486.
- Zorn M. Identifizierung und strukturelle Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen des Formiatstoffwechsels in *Escherichia coli* mittels Massenspektrometrie-basierter Methoden, Doktorarbeit, Institut für Pharmazie, MLU Halle, 2014

6 Anhang

Tabelle A1. Verwendete Stämme in der Doktorarbeit.

Zusammenfassende Übersicht aller in der Doktorarbeit verwendeten *E. coli* Stämme. Die Referenzen sind nachfolgend aufgelistet. [1] Casadaban, 1979 [2] Hunger *et al.*, 2014; [3] Kammel *et al.*, 2021; [4] Kammel *et al.*, 2022a; [5] Kammel und Sawers, 2022a.

Stämme	Genotyp	Referenz
MC4100	$F^- \text{ araD } \Delta(\text{argF lac}) U 169 \text{ ptsF25 deoC1 relA1 fblB530 rpsL } 150 \lambda^-$	[1]
DH4100	MC4100 $\lambda(\text{fdhF}::\text{lacZ})$	[2]
DH701	DH4100 <i>focA</i> (<i>focA</i> -Codons 114 und 115 von UAG zu UAA getauscht)	[2]
DH201	DH4100 <i>focA pflB</i> (Deletion beider Gene)	[2]
DH601	DH701 <i>pflA</i> $\lambda(\text{fdhF}::\text{lacZ})$ (Deletion des <i>pflA</i> -Gens)	[3]
DH4200	DH4100 <i>focA</i> -H209N (<i>focA</i> -Codon 209 von CAC zu AAC getauscht)	[4]
DH4300	DH4100 <i>focA</i> -T91A (<i>focA</i> -Codon 91 von ACT zu GCT getauscht)	[5]

Tabelle A2. Wachstumsdefizit von DH4200 (Foc_{H209N}) in Abhängigkeit vom Kulturmedium.

Die Wachstumsraten wurden für die angegebenen Stämme (Kammel *et al.*, 2022a) anaerob in verschiedenen Kulturmedien bei 37°C bestimmt (vgl. Kammel *et al.*, 2021). Als Medium wurde M9-Minimalmedium mit und ohne Casaminosäuren und das Vollmedium TGYEP (vgl. Begg *et al.*, 1977; Sambrook *et al.*, 1989; Kammel *et al.*, 2021) verwendet. Die Messungen wurden am Spektrophotometer Tecan Infinite M Nano (Tecan, Deutschland) durchgeführt. In der Tabelle sind die Wachstumsraten der exponentiellen Phase und die OD₆₀₀ nach 20 h aufgeführt.

Stämme	M9		M9 + Casaminosäuren		TGYEP	
	μ [h ⁻¹]	OD ₆₀₀	μ [h ⁻¹]	OD ₆₀₀	μ [h ⁻¹]	OD ₆₀₀
DH4100	0,366 ± 0,002	0,67	0,522 ± 0,003	0,71	0,715 ± 0,003	0,64
DH701 (<i>focA</i>)	0,324 ± 0,003	0,70	0,441 ± 0,004	0,78	0,679 ± 0,007	0,71
DH4300 (Foc _{T91A})	0,333 ± 0,001	0,77	0,398 ± 0,003	0,82	0,687 ± 0,002	0,74
DH4200 (Foc _{H209N})	0,333 ± 0,002	0,41	0,464 ± 0,003	0,45	0,680 ± 0,006	0,56

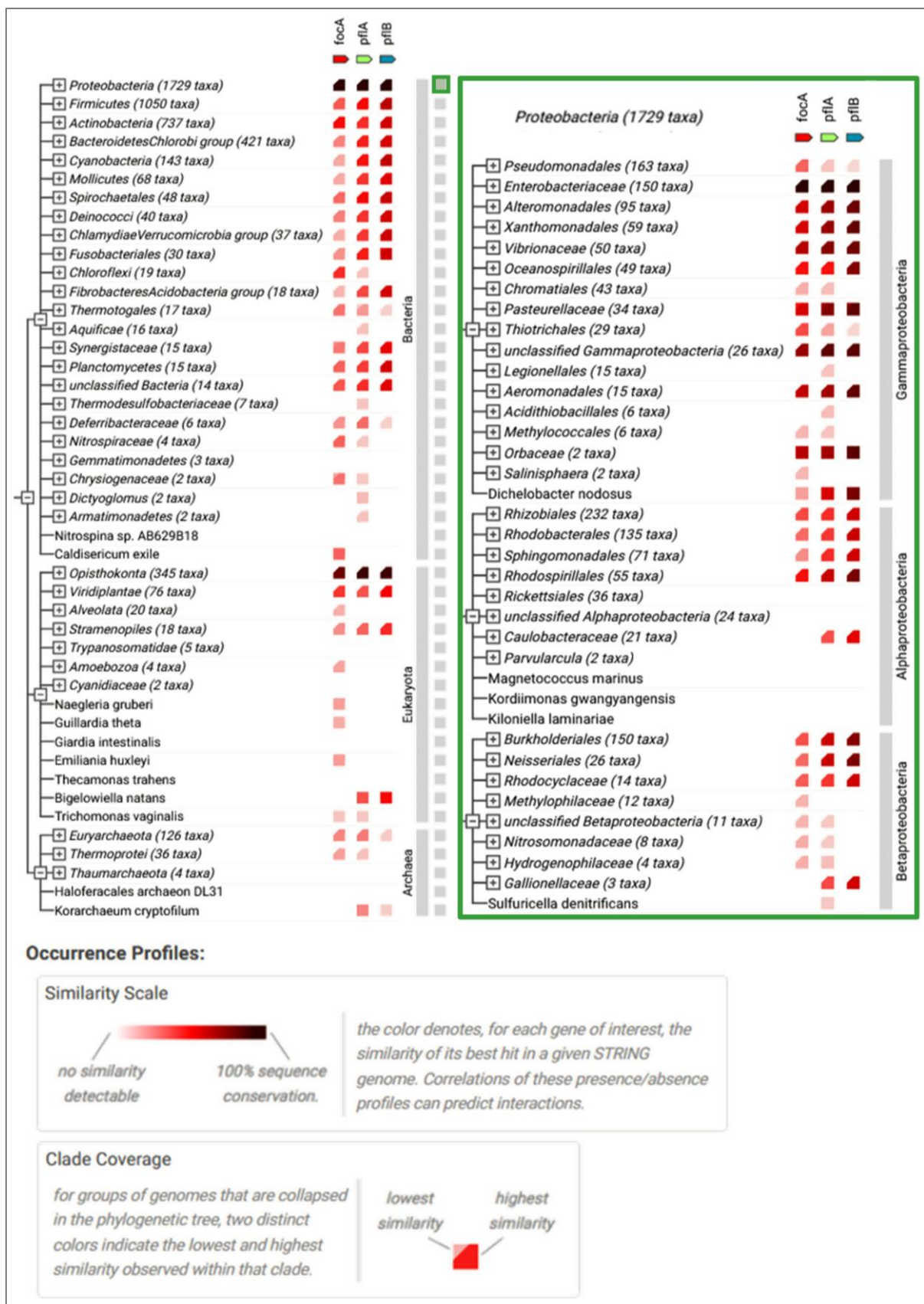


Abbildung A1: Vorkommen der Gene *focA*, *pflB* und *pflA* in allen Domänen.

Die Analyse des Vorkommens von *focA*, *pflB* und *pflA* in allen Lebensdomänen wurde mithilfe der STRING Datenbank (Version 11.5; Szklarczyk *et al.*, 2021) durchgeführt. Dabei wurden die jeweiligen *E. coli* Sequenzen als Ausgangspunkt genutzt. Die Legende im unteren Teil der Abbildung erläutert die Ähnlichkeit der Sequenzen innerhalb der Klade und zum *E. coli* Gen.

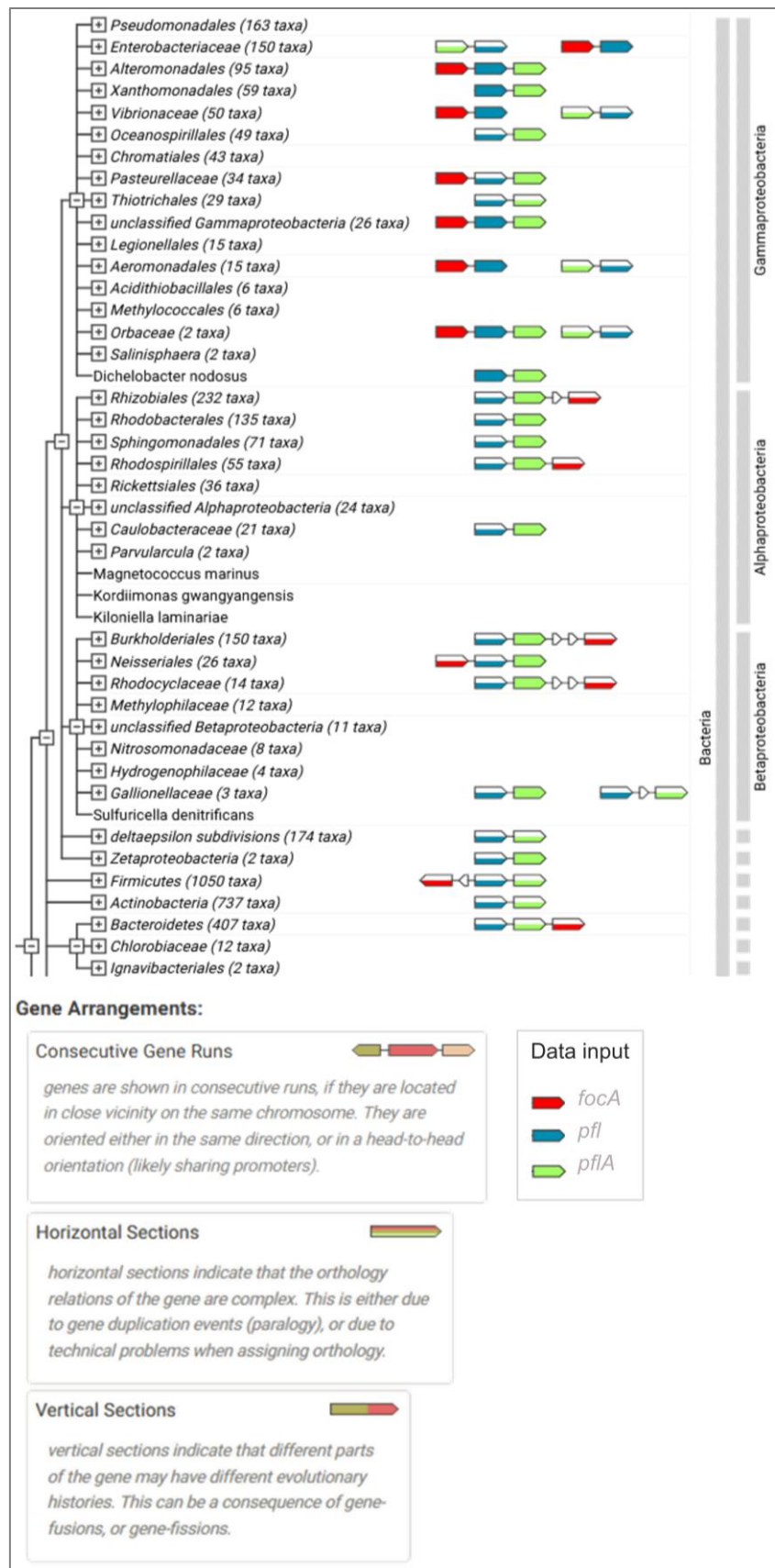


Abbildung A2: Genomische Organisation von *focA*, *pflB* und *pflA* in Bakterien.

Die Analyse der genomischen Organisation von *focA*, *pflB* und *pflA* in Bakterien, vor allem mit Fokus auf die Proteobakterien erfolgte durch die STRING Datenbank (Version 11.5; Szklarczyk *et al.*, 2021). Die jeweiligen *E. coli* Sequenzen dienten als Ausgangspunkt und *focA* wird in Rot, *pflB* in Blau und *pflA* in Grün gezeigt. Die Legende gibt Aufschluss über die möglichen Anordnungen der Gene.

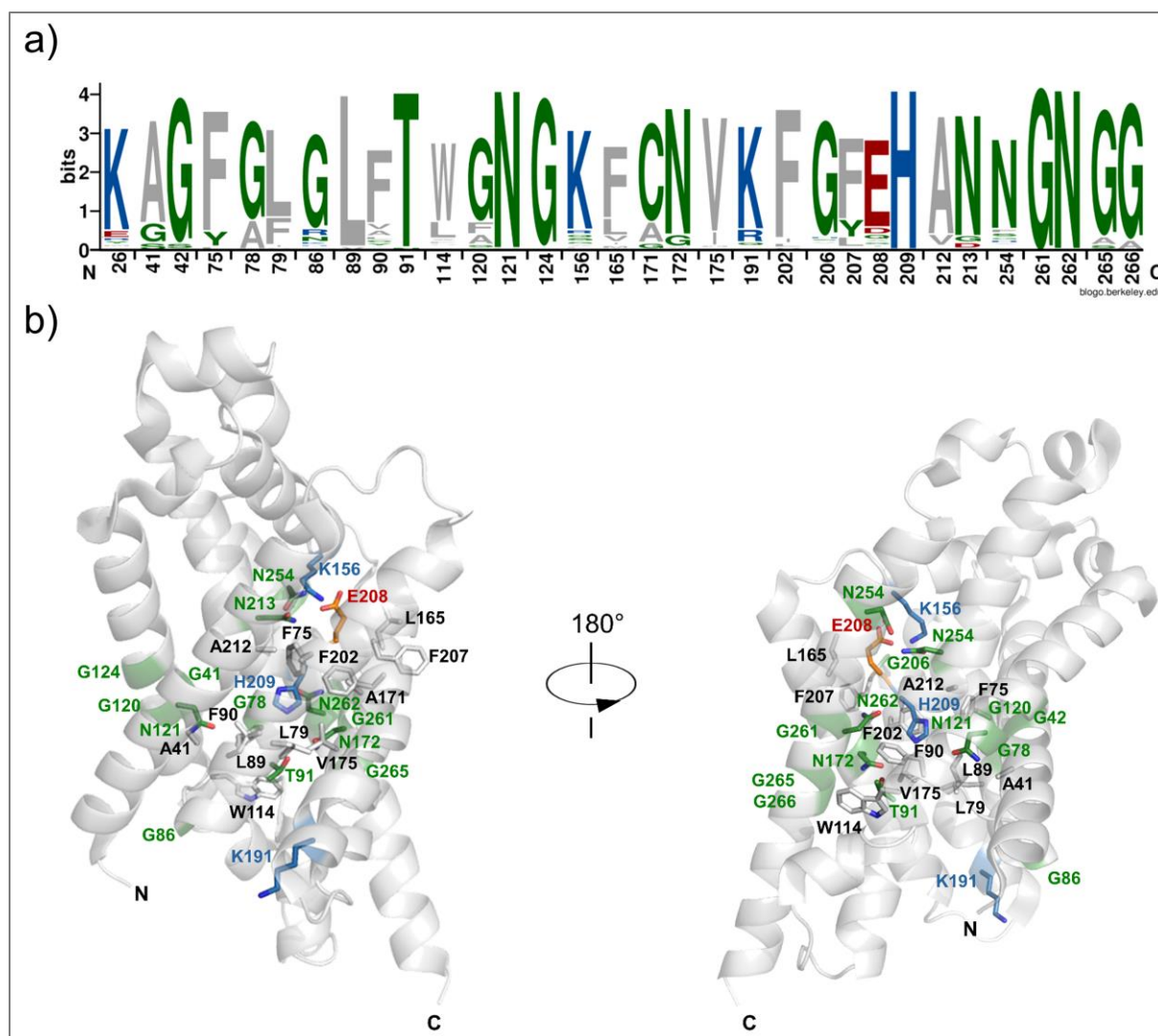


Abbildung A3: Konservierte Aminosäuren in FNTs.

a) Übersicht über die am stärksten konservierten Aminosäuren der FNTs. Die Sequenzen von 165 annotierten FNTs wurden mit *E. coli* FocA aligned (diese Sequenz ist auch die Grundlage für die Nummerierung der Aminosäuren) und die Häufigkeit des Vorkommens dieser Reste wurde mit dem WebLogo 3 online Server analysiert (Crooks *et al.*, 2004). Die am stärksten konservierten Aminosäuren, wobei die Grenze des Vorkommens der Seitenketten auf einen Wert von 66 % festgesetzt wurde, sind nach folgendem Farbschema aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften koloriert: Unpolare Seitenketten (A, F, I, L, M, P, V, W) sind in Grau, polare Reste (C, G, N, Q, T, S, Y) hingegen in Grün gezeigt. Saure Aminosäuren (D, E) sind in Rot und basische Seitenketten (H, K, R) in Blau hervorgehoben.

b) Darstellung der Position der stark konservierten Aminosäuren im *E. coli* FocA Protomer (PDB: 3KCU; Wang *et al.*, 2009). Das Peptidrückgrat ist in der Bänderstruktur und die Aminosäuren mit ihren Seitenketten (Farbe wie a) abgebildet und der N- sowie der C-Terminus, welche die cytoplasmatische Seite des Kanals anzeigen, ist gekennzeichnet.

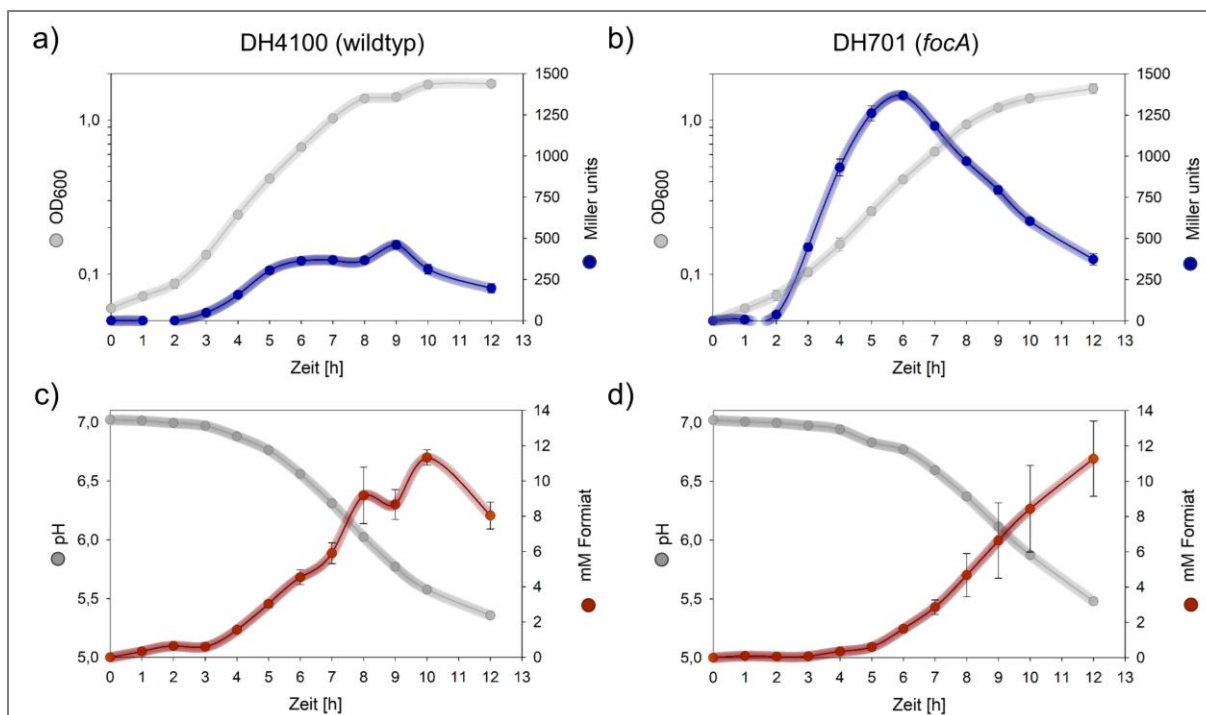


Abbildung A4: Formiat-Profile im *E. coli* Parentalstamm und einer *focA*-Mutante.

Die intra- und extrazellulären Formiat-Level von einem *E. coli* Stamm mit nativem FocA (DH4100, MC4100 $\lambda fdhF_p::lacZ$, a und c) und einer *focA*-Mutante (DH701, MC4100 *focA* $\lambda fdhF_p::lacZ$, b und d) werden gegenübergestellt. Die Stämme wurden in M9-Minimalmedium pH 7 mit Glukose als Kohlenstoffquelle anaerob kultiviert und stündlich wurde die OD₆₀₀, der pH-Wert des Kulturmediums, die β -Galaktosidase-Aktivität und das Formiat-Level im Kulturüberstand nach Kammel *et al.*, 2021 und 2022a bestimmt. a) und b) zeigen die Wachstumskurve und die β -Galaktosidase-Aktivität, welche proportional zur intrazellulären Formiat-Konzentration ist. c) und d) hingegen stellen die absolute Formiat-Konzentration und den pH-Wertes des Kulturmediums dar. Die Abbildung ist eine Modifikation der Abbildung 2 (a, b, e und f) aus Kammel und Sawers, 2022a.

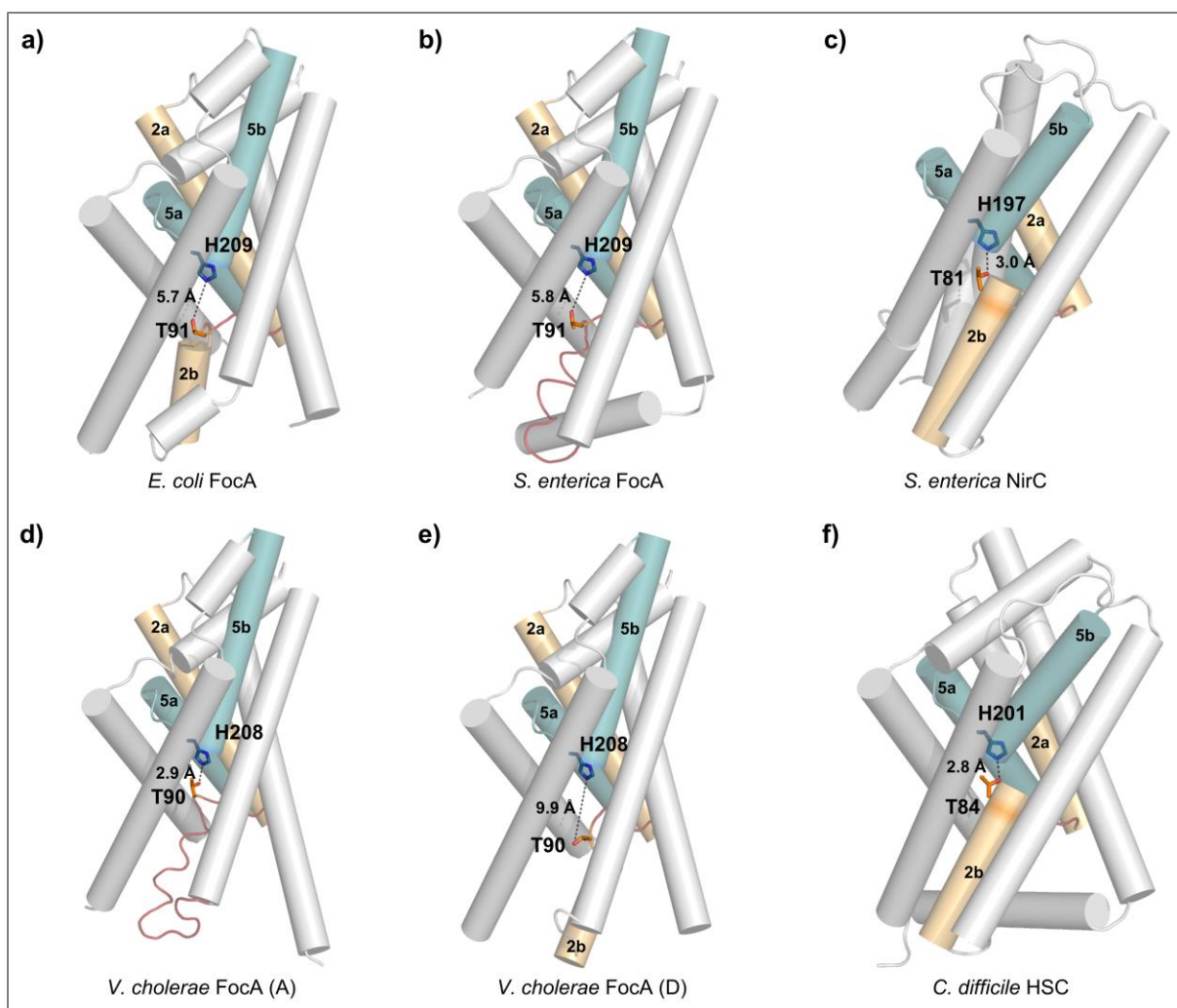


Abbildung A5: Strukturelle Unterschiede der FNTs in Bezug auf TM2 und die Ω -Schleife.

Die Sekundärstrukturen der jeweiligen FNT-Protomere wurden im Bändermodell dargestellt. Dabei sind die Seitenketten der konservierten Aminosäuren Threonin (in Orange) und Histidin (in Blau), sowie die angrenzenden transmembranen Bereiche TM2a und TM2b (helles orange) und TM5a und TM5b (hellblau) sowie die Ω -Schleife (in Rot) hervorgehoben. Mittels PyMOL wurden die Abstände der funktionellen Gruppen berechnet ($N_{\epsilon 2}$ von Histidin und Sauerstoff-Atom der Threonyl-Seitenkette). Dabei sind a, b, d und e Vertreter des Formiat-Kanals FocA.

a) zeigt ein *E. coli* FocA Protomer (PDB: 3KCU; Wang *et al.*, 2009), b) ein *S. enterica* FocA Monomer (PDB: 3Q7K; Monomer A; Lü *et al.*, 2011) und d) und e) unterschiedliche Protomere des *V. cholerae* FocA (PDB: 3KLY; d ist Monomer A und e ist Monomer D; Waight *et al.*, 2010). c) repräsentiert ein *S. enterica* Monomer (PDB: 4FC4; Lü *et al.*, 2012) und f) ein *C. difficile* HSC Protomer (PDB: 3TDR; Czyzewski und Wang, 2012).

a)

10	20	30	40	50		
MKADNPFDLL	LPAAMA	VAE	EAGVY	PAKH	PLKTFYLAIT	AGVFISIAFV
60	70	80	90	100		
FYITATTGTG	TMPPGMAKLV	GGICFSLGLI	LCVVCGADLF	TSTVLIIVAK		
110	120	130	140	150		
ASGRITWGQL	AK	NWLVN	YFG	NLVGALLFVL	LMWLSGEYMT	ANGQWGLNVL
160	170	180	190	200		
QTADHKVHHT	FIEAVCLGIL	ANLMVCLAVW	MSYSGF	SLMD	RAFIMVLPVA	
210	220	230	240	250		
MFVASGFEHS	IANMFMPMG	IVIRDFASPE	FWTAVGSAPE	NFSHLTVMNF		
260	270	280				
ITDNLIPVTI	GNIIGGGLLV	GLTYWVIYLR	ENDHH			

b)

10	20	30	40	50					
MSELNEKLAT	AWEGFTKGDW	QNEVNRDFI	Q	NYTFYEGD	ESFLAGATEA				
60	70	80	90	100					
TTTLWDK	VME	GKLENRTHA	PVDFDTAVAS	TITSHDAGYI	NKQLE	IVGL			
110	120	130	140	150					
QTEAPLKRAL	IPFGGIKIE	G	SCK	Q	NREL	DEMI	Q	LFTE	YRKTHNQGVF
160	170	180	190	200					
DVYTPDILRC	R	KSGVLTGLP	DAYGRGRIIG	DYRRVALYGI	D	Q	LMK	Q	LAQ
210	220	230	240	250					
FTSLQADLEN	GVNLEQTIRL	REEIAEQHRA	LGQMKEMAAK	YGYDISGPAT					
260	270	280	290	300					
NAQEAIQWTY	FGYLAAVKSQ	NGAAMSFGR	STFLDVYIER	DLKAGKI	Q	EQ			
310	320	330	340	350					
EAQEMVDHLV	M	LRMVRFLR	TPEYDELFSG	DPIWATE	S	SIG	GMGLDGRITLV		
360	370	380	390	400					
TKNSFRFLNT	LYTMGPSPEP	NMTILWSEKL	PLNFKKFAAK	VSID	Q	SSLQY			
410	420	430	440	450					
ENDDLMPDF	NNDYAIACC	VSPMIVGKQM	QFFGARANLA	Q	TM	LYAINGG			
460	470	480	490	500					
VDEKLMQVG	P	Q	EPIKGDV	LNYDEVMERM	DHFMDWLAKQ	YITALNIIHY			
510	520	530	540	550					
MHDKYSYEAS	LMALHDRV	RTMACGIAGL	SVAADSLSAI	KYAKVKPIRD					
560	570	580	590	600					
EDGLAIDFEI	EGEYPQFGNN	DPRVDDLAVD	LVERFMKKIQ	KLHTYRDAIP					
610	620	630	640	650					
TQSVLTITSN	VYVGKKTGNT	PDGRRAGAPF	GPGANFMHGR	D	Q	GAVASLT			
660	670	680	690	700					
SVAKLPFAYA	KDGISYTF	SI	VPNALGK	DE	VRKTNLAGLM	DGYFHHEASI			
710	720	730	740	750					
EGGQHLNVNV	MNREMLLDAM	ENPEK	Q	P	Q	L	IRVSGYAVRF	NSLTKEQQD	
760									
VITRTFTQSM									

Abbildung A6: Proteinsequenzen von *E. coli* FocA und PflB.

Die Proteinsequenzen wurden von der UniProt-Webseite entnommen (UniProt Consortium 2021; a - FocA (P0AC23); b – PflB (P09373)). Die Aminosäuren, die in den jeweiligen *in vitro* Vernetzungsanalysen identifiziert wurden, sind farblich hervorgehoben. In Rot umrandet sind die Seitenketten, welche mit dem Bis-Sulfosuccinimidylglutarat-Vernetzungsreagenz reagierten (Doberenz *et al.*, 2014). Neuere Studien durchgeführt von Jana Lorenz (Arbeitsgruppe von A. Sinz, MLU Halle) nutzten weitere Vernetzungsagenzien: DSBU (Disuccinimidyl-Dibutyrat-Harnstoff) und Sulfo-SDA (Sulfo-Succinimidyl-Diazirin) (unveröffentlichte Daten). Die mit DSBU identifizierten interagierenden Seitenketten sind in Pink unterstrichen und die mit sulfo-SDA in Orange.

Tabelle A3. Zusammenfassung der Vernetzungen von *E. coli* FocA und PflB.

Die Ergebnisse der *in vitro* Vernetzungsanalysen von gereinigtem FocA (Peptid des N-Terminus oder Volllängenprotein) sind nachfolgend zusammengefasst. Es wurden verschiedene Agenzien verwendet um die Seitenketten der Proteine zu vernetzen, welche anschließend entweder durch Affinitätschromatographie oder gelelektrophoretisch getrennt und isoliert wurden, um final über massenspektrometrische Methoden detektiert werden zu können (vgl. Doberenz *et al.*, 2014; Daten von J. Lorenz der Arbeitsgruppe A. Sinz, MLU Halle). Die Vernetzungsagenzien waren Sulfosuccinimidyl-Glutarat (abgekürzt mit BS²G; Abstandshalter 7,7 Å), Sulfo-Succinimidyl-Diazirin (Sulfo-SDA, Abstandhalter 3,9 Å) und Disuccinimidyl-Dibutyl-Harnstoff (DSBU, Abstandhalter 12,5 Å). Je nach Agenz sind die Vernetzungen auf verschiedene Aminosäure-Seitenketten beschränkt. BS²G und DSBU verknüpfen, da die reaktive Gruppe ein (Sulfo)-NHS-Ester ist, primäre Amine und auch Hydroxyl-Gruppen von Aminosäuren (Müller *et al.*, 2010). Der heterobifunktionale Vernetzer Sulfo-SDA hingegen kann über die Diazirin-Funktion mit jeder Seitenkette oder dem Peptidrückgrat reagieren (Gomes *et al.*, 2010). Die Ergebnisse der Vernetzung mit BS²G sind in [1] Doberenz *et al.*, 2014 veröffentlicht und die mit Sulfo-SDA und DSBU erhaltenen unveröffentlichten Daten stammen von [2] J. Lorenz (Arbeitsgruppe A: Sinz, MLU Halle).

Vernetzungsagenz	Vernetzte Aminosäuren		Bedingungen	Referenz
	FocA	PflB		
BS ² G	K17	K32/Y126/Y192/K312/ S338/K441/K643	Vernetzung von Volllängen- FocA mit PflB	[1]
	K26	K197/Y726		
	T28	K96		
	K29	T395		
	K112	S463		
	S187	K136		
	K191	T298		
Sulfo-SDA	D4	K17/K57/K677	Vernetzung von Volllängen- FocA mit PflB	[2]
	E240	Y325		
DSBU	Y25	K162	Vernetzung vom N-terminalen FocA Peptid (Aminosäure 1-32) mit PflB	[2]
	K26	S163		
	K29	K386/K390/K454		

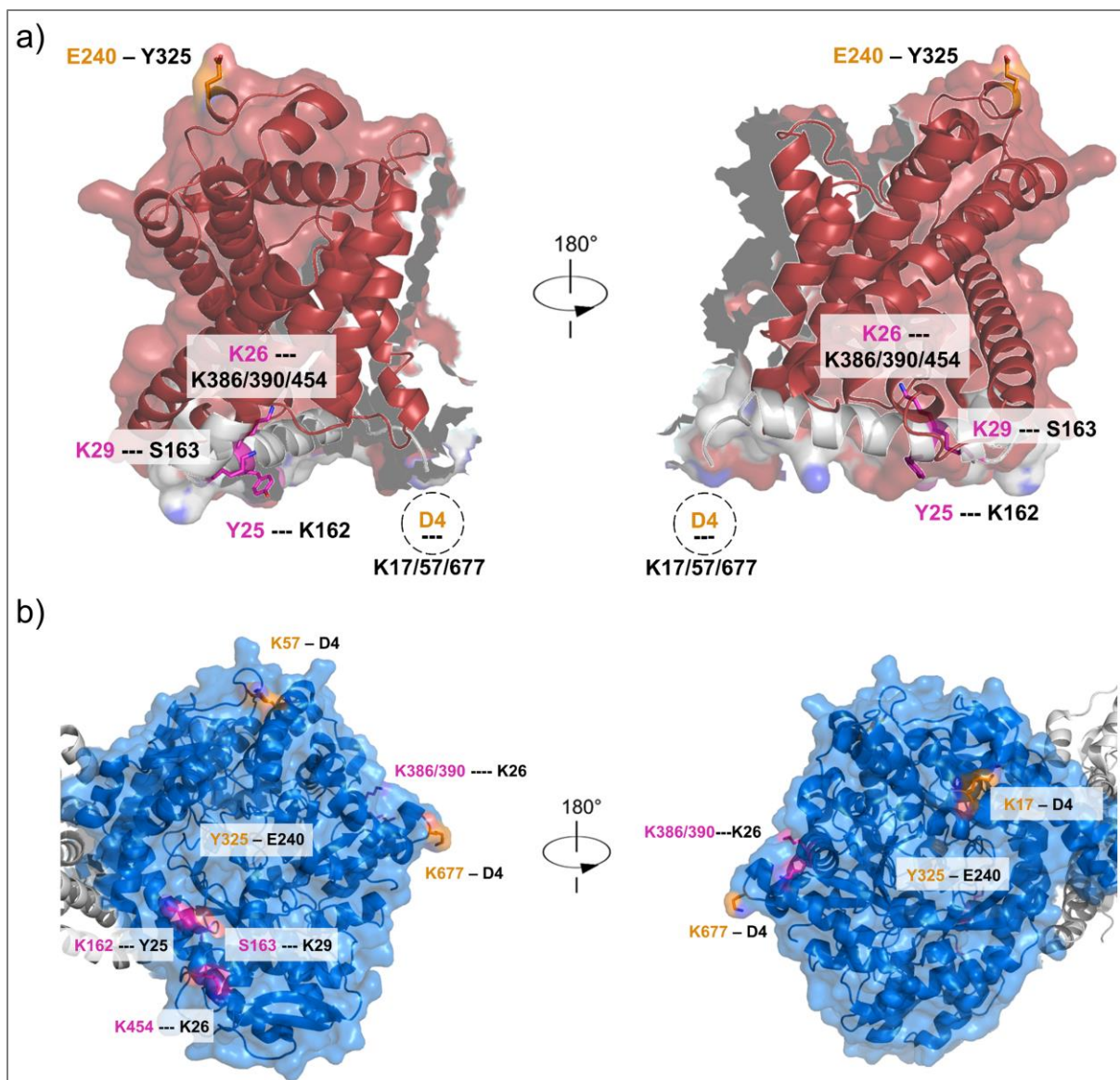


Abbildung A7: Identifizierte Aminosäure-Seitenketten der Vernetzung von *E. coli* FocA mit PflB.

Ein *E. coli* FocA Protomer (a; unveröffentlichte Cryo-EM Struktur, Kooperation mit P. Kastritis, MLU Halle) und das *E. coli* PflB-Dimer (b; PDB: 1H18; Becker und Kabsch, 2002) wurden im Bändermodell mit der Oberfläche dargestellt. In jeweils einem der Proteine sind die in Vernetzungsstudien identifizierten Aminosäuren farbig und mit dem entsprechend anderen interagierenden Aminosäurerest (in Schwarz) des anderen Proteins gekennzeichnet. Es wurden sowohl die identifizierten Reste in Analysen der Interaktion des Volllängen-FocA und PflB mit Sulfo-SDA (Sulfo-Succinimidyl-Diazirin) in Orange, als auch die Aminosäuren, welche in der Interaktion des Volllängen-PflBs mit einem *N*-terminalen FocA-Peptid (umfasst die ersten 32 Aminosäuren der Wildtyp-Sequenz aus *E. coli*) mit dem Reagenz DSBU (Disuccinimidyl-Dibutyrat-Harnstoff) bestimmt wurden, in Pink hervorgehoben. Die Studien wurden von J. Lorenz durchgeführt (Arbeitsgruppe von A. Sinz, MLU Halle; unveröffentlichte Daten).

a) Vernetzungen im *E. coli* FocA Protomer (in Rot). Der *N*-Terminus, welcher sich im Cytoplasma befindet, ist in Grau gefärbt und da die erste *N*-terminal aufgelöste Aminosäure der Cryo-EM-Struktur F7 ist, wurde die mögliche Position von D4 angedeutet.

b) Vernetzung in einem der Monomere des *E. coli* PflB-Dimers (in Blau).

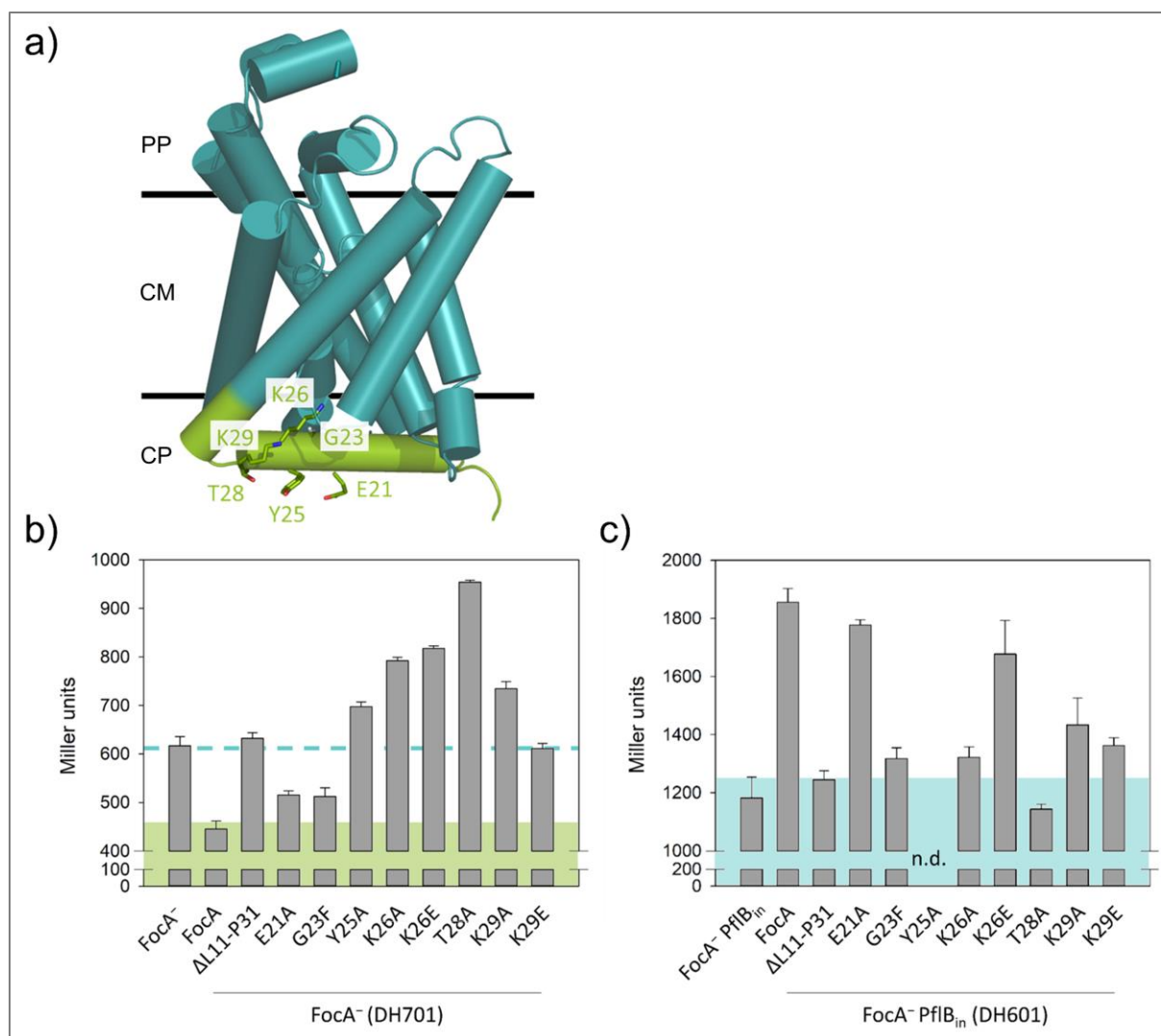


Abbildung A8: Einfluss der N-terminalen Aminosäuren von FocA auf die Formiat-Translokation.

a) Schematische Darstellung des *E. coli* FocA Protomers mit den α -Helices als Zylindern (in Blau, unveröffentlichte Cryo-EM Struktur, Kooperation mit P. Kastritis, MLU Halle) einschließlich der Aminosäure-Seitenketten des proximalen Teils des *E. coli* FocA N-Terminus, welche für Translokationsuntersuchungen ausgetauscht wurden. Der vollständige N-Terminus (ab D8) ist in Grün hervorgehoben. Die Position des Protomers in der cytoplasmatischen Membran (CM) ist angedeutet und das Cytoplasma (CP) und das Periplasma (PP) sind beschriftet.

b) Formiat-Translokation wurde in der *focA*-Mutante DH701 (MC4100 *focA* *lfdhF_P::lacZ*; Hunger *et al.*, 2014) untersucht, welche mit Plasmiden, welche die angegebenen FocA-Austauschvarianten codieren, komplementiert wurde. b) Die Formiat-Aufnahme wurde in der *focA pflA*-Mutante DH601 (MC4100 *focA pflA* *lfdhF_P::lacZ*; Kammel *et al.*, 2021), dessen PflB in der inaktiven Form vorliegt, untersucht.

Die Zellen wurden wie in Kammel *et al.*, 2021; 2022a beschrieben in M9-Minimalmedium mit 0,8 % (w/v) Glukose kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} \sim 0,7 - 0,9$) auf die β -Galaktosidase-Aktivität analysiert. Beim Stamm DH601 wurde das Kulturmedium mit 20 mM Natriumformiat supplementiert.

Die Experimente wurden zweifach mit mindestens drei biologischen Replikaten wiederholt. Die β -Galaktosidase-Aktivität ist als Mittelwert mit der Standardabweichung dargestellt.

7 Danksagung

Die Anfertigung dieser Arbeit war eine intensive Zeit und ich wertschätze es sehr, dass ich dabei auf die Unterstützung vieler Leute zählen konnte, denen ich an dieser Stelle meinen Dank zum Ausdruck bringen möchte.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Gary Sawers bedanken, ohne den diese letzten vier Jahre nicht annähernd so erfolg- und publikationsreich gewesen wären.

>> Gary, auch wenn ich nicht zu jedem Zeitpunkt ähnlich enthusiastisch wie du war, als wir Vorschläge für neue Mutanten diskutiert haben, hast du es immer geschafft mich mit deiner Leidenschaft für die Forschung anzustecken. Ich weiß es sehr zu schätzen, dass ich von deiner etwa 30-jährigen FocA-Erfahrung profitieren und viel von dir lernen konnte. Danke, dass du mir stets viel Vertrauen entgegengebracht hast und immer ein offenes Ohr dafür hattest, mit mir über die neuen Ergebnisse, die oft mehr Fragen als Antworten lieferten, und die Komplexität des Themas zu diskutieren. Es war mir eine Freude im Rahmen der Doktorarbeit mit dir das Puzzle des Translokationsmechanismus von FocA, zumindest wie wir ihn momentan annehmen, Stück für Stück zusammensetzen. <<

Vielen Dank an apl. Prof. Dr. Ralph Golbik für die fachliche Diskussion bezüglich des Translokationsmechanismus und auch für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Zudem möchte ich mich bei Prof. Dr. Johann Heider, für die Bereitschaft das Drittgutachten anzufertigen, bedanken.

Ich weiß es zu schätzen, dass ich auch auf die fachliche Unterstützung von unseren Kooperationspartnern zurückgreifen konnte. Prof. Dr. Karen Trchounian und Liana Vanyan danke ich für die unkomplizierte und gute Zusammenarbeit, denn ihre Untersuchungen zum Protonenflux haben uns wertvolle Hinweise zum Mechanismus von FocA gegeben. Ein Dank geht an die Arbeitsgruppe um Jun.-Prof. Panagiotis Kastritis für die Cryo-EM-Messungen ausgewählter FocA-Varianten. Ich möchte mich zudem bei Jana Lorenz und Prof. Dr. Andrea Sinz bedanken, die durch Ihre Vernetzungsstudien von FocA und PflB gute Hinweise lieferten, welche Aminosäuren des FocA-N-Terminus auch *in vivo* bedeutsam sein könnten. Für fachliche Diskussion bedanke ich mich außerdem bei Andreas Simon.

Ein großes Dankeschön geht an alle ehemaligen Doktoranden und Studenten der AG Sawers, welche sich auch mit FocA-Forschung beschäftigt haben und dabei die Grundlagen der von mir genutzten Systeme gelegt haben. Ihre Vorarbeiten haben meinen Start in der Promotionszeit erheblich erleichtert.

Einen herzlichen Dank möchte ich meinem Masterstudenten Oliver Trebbin aussprechen.

>> Olli, danke, dass du mit deiner gewissenhaften und fleißigen Art einen großen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet hast. Mir haben die Zusammenarbeit und auch die Fachsimpelei, die oft außerhalb unserer Kernkompetenz lag, stets viel Freude bereitet. <<

Auch bei meiner Bachelorstudentin Sissy Schnabel möchte ich mich für ihre Unterstützung bei Experimenten zu den Glycyl-Radikal-Enzymen bedanken.

Generell gebührt ein großes Dankeschön den beiden Mikrobiologie-Arbeitsgruppen. >>Ob es eine Weinverkostung zum Landeserkundungstag, oder die vielen netten Kuchenrunden waren, ich hatte eine

schöne Zeit mit euch. Es war super, dass ich auf eure fachliche und auch allgemein organisatorische Unterstützung zurückgreifen konnte. <<

An dieser Stelle möchte ich die Post-Docs der Arbeitsgruppe hervorheben. Vielen lieben Dank an PD Dr. Constanze Pinske und Dr. Dörte Falke für das geduldige Stämme-Heraussuchen und die fachliche Unterstützung. >> Conny und Dörte, besten Dank an euch, dass ihr immer Zeit und Muße hattet mir bei vielen Fragen und Herausforderungen zu helfen. Conny, tausend Dank auch fürs Korrekturlesen und fürs Stiften der Kaffeemaschine, ohne die diese Arbeit auch definitiv nicht möglich gewesen wäre. << Ein Chapeau für Dr. Marco Fischer, dass die Labore und Praktika immer gut organisiert sind. >> Marco, ich weiß es sehr zu schätzen, dass du uns Doktoranden versuchst, mit vielen Dingen den Rücken freizuhalten, und profitiere gern von deiner Etikettierleidenschaft. <<

Vielen Dank an Alexander Haase und Dorothea Lubek, mit denen ich viele schöne und manchmal auch therapeutische Kaffeepausen verbracht habe. >> Danke, dass ihr in den letzten vier Jahren viele lustige Momente, aber auch jeden Frust über gescheiterte Experimente, jedes Zittern um die nächste Vertragsverlängerung und so manchen langen Labortag mit mir geteilt habt. <<

Darüber hinaus geht diesbezüglich auch ein Dank an Franzi, Vlada, Diana, sowie andere ehemalige Studenten und Doktoranden der Arbeitsgruppe.

Ein lieber Dank gebührt auch Nadine Bethge, die gute und bestinformierte Seele des Instituts.>> Besten Dank, dass du mich in den letzten zwei Jahren so viel im Labor unterstützt hast. <<

Auf keinen Fall möchte ich auch meine sehr prägende Zeit am IPB missen, in der aus vielen Kollegen Freunde geworden sind. Zunächst einmal möchte ich mich bei den glorreichen Doktorfischen, so würde ich die Nemos nun korrekterweise bezeichnen, Anja K. und Pascal bedanken. >> Unabhängig von allen Umständen, haben uns die gemeinsamen Jahre zusammengeschweißt und ich hatte eine großartige Zeit mit euch. Ihr habt meinen vollen Respekt, dass ihr Beide das so beeindruckend durchgezogen habt. <<

Darüber hinaus verdienen ganz viele liebe Menschen ein Dankeschön nicht nur dafür, was ich alles fachlich von ihnen lernen durfte, sondern auch für tolle Brunch-Runden und private Treffen. Daher geht ein herzlicher Dank an Annegret, Pauline, Sarah S., Pia, Robert, Lana, Lea, Rica und Anja E.

Nicht zuletzt gebührt ein nicht in Worte zu fassender Dank auch meinen Herzensmenschen, die in den letzten Jahren immer für mich da waren, schöne Erlebnisse und Reisen mit mir geteilt haben, mich in vielen Situationen zum Lachen gebracht haben und die meine Welt sehr viel bunter machen.

>> Stefan, Lisa + Joni, Anne, Uli, Sarah N. + Familie, Kerstin und Jonas – Ich bin so froh, dass ich euch habe. <<

Mein finaler Dank gilt meiner Familie, denen ich für ihre Unterstützung und Verständnis nicht genug danken kann. >>Danke, dass ihr bedingungslos für mich da seid, mich immer auffängt und ermutigt, alle kleinen und großen Erfolge mit mir feiert und einfach für Alles! <<



8 Darlegung des Eigenanteils an den Publikationen

Kapitel 1

- I) The soluble cytoplasmic N-terminal domain of the FocA channel gates bidirectional formate translocation – *Molecular Microbiology* 2021

Autoren: Michelle Kammel, Doreen Hunger und R. Gary Sawers

Eigenanteil: Datenerhebung (95 %): Planung, Durchführung (mit Ausnahme der Mutagenese einiger *focA*-Varianten) und Auswertung aller Experimente

Manuskript (25 %): Anfertigung der Abbildungen, Entwurf des Material und Methodenteils.

Kapitel 2

- II) A single amino acid exchange converts FocA into a unidirectional efflux channel for formate – *Microbiology* 2022

Autoren: Michelle Kammel, Oliver Trebbin, Constanze Pinske und R. Gary Sawers

Eigenanteil: Datenerhebung (90 %): Planung, Durchführung (Vorarbeiten des Masterstudenten Oliver Trebbin) und Auswertung aller Experimente

Manuskript (25 %): Anfertigung der Abbildungen, Material und Methodenteil

Kapitel 3

- III) Interplay between the conserved pore residues Thr-91 and His-209 controls formate translocation through the FocA channel – *Microbial Physiology* 2022

Autoren: Michelle Kammel, Oliver Trebbin und R. Gary Sawers

Eigenanteil: Datenerhebung (85 %): Planung, Durchführung (mit Ausnahme der Datensätze für Abbildung 2, welche durch Oliver Trebbin im Rahmen seiner Masterarbeit erhoben wurden) und Auswertung der Experimente

Manuskript (30 %): Anfertigung der Abbildungen, Material und Methodenteils, Passagen des Manuskripts zu den experimentellen Daten.

Bestätigung des Eigenanteils durch den korrespondierenden und einen weiteren Co-Autor:

Michelle Kammel

Prof. Dr. Gary R. Sawers

PD Dr. Constanze Pinske

9 Publikationsverzeichnis

Kammel M, Hunger D, Sawers RG. The soluble cytoplasmic N-terminal domain of the FocA channel gates bidirectional formate translocation. *Mol Microbiol.* 2021; 115(4):758-773.

Kammel M, Sawers RG. Distinguishing functional from structural roles of conserved pore residues during formate translocation by the FocA anion channel. *MicrobiologyOpen.* 2022; 11(4): e1312.

Kammel M, Sawers RG. The autonomous glycyl radical protein GrcA restores activity to inactive full-length pyruvate formate-lyase *in vivo*. *J Bacteriol.* 2022; 204(5):e0007022.

Kammel M, Sawers RG. The FocA channel functions to maintain intracellular formate homeostasis during *Escherichia coli* fermentation. *Microbiology (Reading).* 2022; 168(4):10.1099/mic.0.001168.

Kammel M, Trebbin O, Pinske C, Sawers RG. A single amino acid exchange converts FocA into a unidirectional efflux channel for formate. *Microbiology (Reading).* 2022; 168(1):001132.

Kammel M, Trebbin O, Sawers RG. Interplay between the conserved pore residues Thr-91 and His-209 controls formate translocation through the FocA channel. *Microb Physiol.* 2022; 32(3-4):95-107.

Kammel M, Pinske C, Sawers RG. FocA and its central role in fine-tuning pH homeostasis of enterobacterial formate metabolism. *Microbiology (Reading).* 2022;168(10):10.1099/mic.0.001253.

10 Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrads bewerbe, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale), August 2022

Michelle Kammel