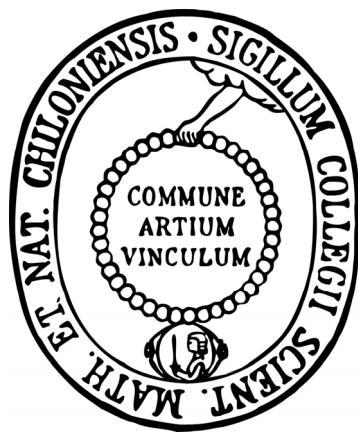


Untersuchung der Kationenfiltermechanismen in Aquaporin-1



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

vorgelegt von

Christina Steinbronn

Kiel 2009

Referent: Prof. Dr. Eric Beitz
Korreferent: Prof. Dr. Edmund Maser
Tag der mündlichen Prüfung: 09.12.2009
Zum Druck genehmigt: 09.12.2009

Prof. Dr. Lutz Kipp
(Dekan)

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	v
1 Einleitung	1
1.1 Funktion und Einteilung der Aquaporine	2
1.2 Pharmazeutische Relevanz.....	3
1.3 Struktur der Aquaporine	6
1.4 Selektivitätsmechanismen von Aquaporinen.....	7
1.5 Protonenausschluss in Aquaporinen	10
1.6 Zielsetzung der Arbeit	15
2 Material	17
2.1 Enzyme, Kits und Chemikalien.....	17
2.2 Geräte und Materialien.....	19
2.3 Oligonukleotide (Primer).....	22
2.4 Plasmide	25
2.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	28
2.6 <i>Escherichia coli</i> -Stämme	28
2.7 Puffer und Lösungen	28
2.7.1 Molekularbiologie.....	28
2.7.2 Proteinchemie.....	30
3 Methoden	37
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	37
3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	37
3.1.2 Anlegen von Bakteriendauerkulturen	37
3.1.3 Agarose-Flachbett-Gelelektrophorese.....	37
3.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	38
3.1.5 Restriktionsverdau von DNA	39
3.1.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
3.1.7 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	40
3.1.8 Entsalzung von DNA	41
3.1.9 Glätten von überhängenden DNA-Enden (Klenow-Behandlung)	41
3.1.10 5'-DNA-Dephosphorylierung.....	41

Inhaltsverzeichnis

3.1.11 Ligation von DNA.....	41
3.1.12 Sequenzierung von DNA	41
3.1.13 <i>In vitro</i> Mutagenese	42
3.1.14 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	43
3.1.15 Standardtransformation von <i>E. coli</i>	44
3.1.16 Schnelltransformation von <i>E. coli</i>	45
3.1.17 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
3.1.18 Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
3.2 Allgemeine proteinchemische Methoden.....	46
3.2.1 Bio-Rad-Proteinbestimmung	46
3.2.2 SDS-Polyacrylamidgelektrophorese	46
3.2.3 Blotting.....	47
3.3 Proteinexpression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
3.3.1 Methylamin-Efflux-Assay	49
3.3.2 Ammoniak-/Ammoniumaufnahmeassay	51
3.3.3 Kaliumaufnahmeassay	53
3.3.4 Natriumstresstest.....	54
3.3.5 pH-Stresstest.....	54
3.3.6 Wachstumskurvenanalyse mit dem <i>Bioscreen</i>	55
3.3.7 Präparation der mikrosomalen Fraktion aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..	56
3.4 Proteinexpression in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	56
3.4.1 Oozyten-Präparation	56
3.4.2 cRNA-Synthese	57
3.4.3 Oozyten-Injektion.....	57
3.4.4 Standard-Oozyten-Schwelltest	57
3.4.5 Expressionskontrolle in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	59
3.5 Zellkultur von HEK-293-Zellen	60
3.5.1 Passagieren der HEK-293-Zellen	60
3.5.2 Anlegen und Auftauen von Dauerkulturen.....	60
3.5.3 Bestimmung der Zellzahl	61
3.5.4 Beschichtung mit Poly-L-Lysin	61
3.5.5 Transiente Transfektion von HEK-293-Zellen.....	61

3.6 Expression in <i>Allium porrum</i> -Epidermiszellen	61
3.7 <i>In vivo</i> pH-Messung durch Fusion der AQP1-Mutanten mit ratiometrischem pHluorin	63
3.8 Membranproteinexpression und -reinigung	65
3.8.1 Expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	65
3.8.2 Affinitätschromatographie an Ni ²⁺ -NTA	65
3.9 Klonierungsarbeiten/Mutationen.....	65
3.9.1 Mutanten im Hefevektor pRS426MET	66
3.9.2 Mutanten im Oozytenvektor pOG1	67
3.9.3 Generierung der pHluorin-AQP1-Konstrukte.....	67
3.9.4 Klonierungen für die Proteinexpression und -reinigung.....	71
4 Ergebnisse	73
4.1 Charakterisierung der Protonenfilterfunktion der NPA-Region durch Mutationsanalyse	73
4.2 Testung der AQP1-Mutanten in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Wachstumsassays	74
4.2.1 Untersuchung der Methylamin-/Methylammonium-Permeabilität.....	75
4.2.2 Untersuchung der Ammoniak-/Ammoniumpermeabilität	78
4.2.3 Untersuchung der Kaliumionenpermeabilität.....	81
4.2.4 Untersuchung der Natriumionenpermeabilität.....	83
4.2.5 Untersuchung der Protonenpermeabilität.....	87
4.3 Charakterisierung der AQP1-Mutanten in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	91
4.3.1 cRNA-Synthese	91
4.3.2 Messung der Wasserpermeabilität	92
4.3.3 Messung der Harnstoff- und Glycerolpermeabilität	95
4.3.4 Expressionskontrolle in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	98
4.4 Elektrophysiologische Untersuchung der AQP1-Mutanten.....	103
4.5 <i>In vivo</i> pH-Messung durch Fusion der AQP1-Mutanten mit ratiometrischem pHluorin.....	107
4.5.1 Expression der pHluorin-Konstrukte in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	107
4.5.2 Expression der pHluorin-Konstrukte in <i>Allium porrum</i>	112
4.5.3 Expression der pHluorin-Konstrukte in HEK-293-Zellen.....	113

4.6 Vorbereitung der Proteinreinigung von AQP1 N76D/H180A/R195V	115
5 Diskussion	117
5.1 Die NPA-Region als Alkalikationenfilter.....	118
5.2 Kombinierte Mutationen in NPA- und ar/R-Region.....	119
5.3 Permeabilität der Kationen leitenden Mutanten.....	121
5.4 Selektivität der Kationen leitenden Mutanten	125
5.5 Zusammenspiel von zwei Filterregionen	127
5.6 Mögliche evolutionäre Entwicklung der beiden Kationenfilter.....	130
5.7 Diskussion der Methoden.....	131
5.8 Ausblick.....	133
6 Zusammenfassung	135
7 Summary	137
8 Literaturverzeichnis	139
9 Anhang	153
9.1 Sequenz von AQP1 aus der Ratte	153
9.2 Sequenz von ratiometrischem pHluorin.....	154

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
AP-Medium	Arginin-Phoshat-Medium
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP	Aquaporin
ar/R-Region	aromatische Arginin-Region
b	Basen
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
GFP	grün fluoreszierendes Protein aus <i>Aequoria victoria</i>
hAQP1	<i>human AQP1</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HEK-293-Zellen	<i>Human Embryonic Kidney-Zellen</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
kDa	Kilodalton
LB	<i>Luria broth</i> (Nährmedium zur Aufzucht von <i>E. coli</i> nach Luria und Burrous)
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
Ni ²⁺ -NTA	Nickelnitrilotriessigsäure
NPA	Asparagin-Prolin-Alanin
OD ₆₀₀	Optische Dichte, gemessen bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>

Abkürzungsverzeichnis

PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rAQP1	<i>rat AQP1</i>
SD-Medium	Synthetisches Dextrose Minimalmedium zur Selektion von transformierten <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Zellen
SDS	Natriumlaurylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	Reichhaltiges Nährmedium zur Aufzucht von untransformierten <i>S. cerevisiae</i> (<i>yeast extract peptone dextrose</i>)

1 Einleitung

Die Entstehung der Zellmembran machte Leben möglich und stellte die Zelle sogleich vor ein Problem. Denn Lipidmembranen sind für viele Stoffe undurchlässig, die für die Zelle überlebensnotwendig sind. Die Entwicklung von Transportproteinen war darum ein entscheidender Schritt in der Evolution. Kanäle und Transporter in der Membran schaffen geregelte Wege für den selektiven Austausch von Wasser, Ionen, Nährstoffen und Abfallprodukten des Zellstoffwechsels.

Da das Innere der Lipiddoppelschicht hydrophob ist, gelangen unpolare Moleküle wie Sauerstoff, Kohlendioxid oder Steroidhormone durch einfache Diffusion hindurch. In deutlich geringerem Umfang gilt dies auch für kleine polare Moleküle wie Wasser und sehr eingeschränkt für z.B. Glycerol. Größere polare oder geladene Moleküle wie Zucker, Aminosäuren, Nukleotide sowie alle Ionen werden dagegen fast vollständig ausgeschlossen. Daher fällt es schwer, sich eine Zellmembran ohne Transportproteine vorzustellen. Abbildung 1.1 gibt eine Übersicht über die unterschiedlichen Membrantransportmechanismen.

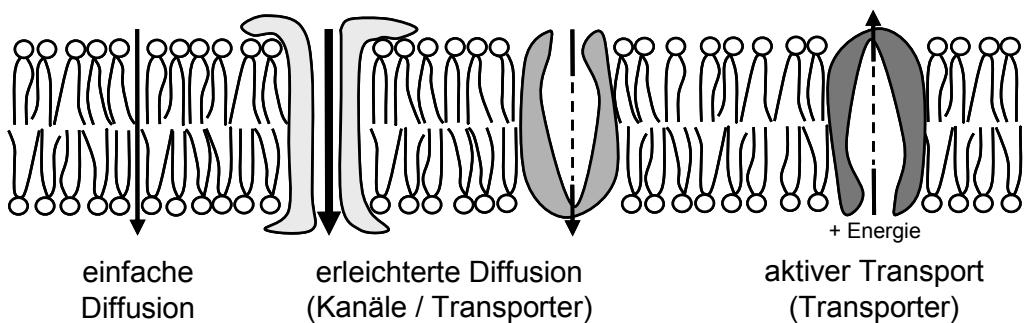


Abbildung 1.1: Übersicht über die unterschiedlichen Membrantransportmechanismen: einfache Diffusion durch die Lipiddoppelschicht, passiver Transport in Richtung des Konzentrationsgradienten über Kanäle und Transporter sowie aktiver Transport entgegen des Konzentrationsgradienten unter Energieverbrauch (ATP, Ionengradient)

Besonders der Transport von Wasser über die Zellmembran ist für viele Funktionen im Organismus von Bedeutung. So kann Wasser zwar hindurchdiffundieren, jedoch ist hierfür eine relativ hohe Aktivierungsenergie notwendig ($E_a > 10 \text{ kcal/mol}$) (Agre et al., 1993). Alternativ können Wassermoleküle auch zusammen mit den jeweils spezifischen Substraten über Transporter wie den Natrium/Glucose-Transporter durch die

Membran gelangen. Die Wasserdurchlässigkeit bleibt so jedoch begrenzt und kann nicht unabhängig reguliert werden.

Bestimmte Zellen, wie Erythrozyten und Zellen des proximalen Tubulus der Niere, besitzen eine für Wasser außerordentlich durchlässige Membran, wofür die früher bekannten unspezifischen Transportwege lange Zeit keine Erklärung boten. Wegen der dort gefundenen hohen Diffusionsgeschwindigkeit und der für die Wasserpassage benötigten kleinen Aktivierungsenergie von weniger als 5 kcal/mol wurde vermutet, dass spezielle Wasserkanäle existieren müssten (Sidel und Solomon, 1957). Diese wurden schon vor ihrer Identifizierung anhand der reversiblen Hemmbarkeit durch Quecksilberionen charakterisiert (Macey, 1984).

Doch erst 1992 entdeckte Peter Agre bei der Untersuchung von Rhesusproteinen aus Erythrozyten zufällig das erste funktionelle Aquaporin (AQP1) (Preston *et al.*, 1992). Inzwischen wurden in Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren mehr als 450 verschiedene Aquaporine entdeckt (Zardoya, 2005). Im Menschen wurden dreizehn Isoformen identifiziert (AQP0-12) (Detmers *et al.*, 2006).

1.1 Funktion und Einteilung der Aquaporine

Aquaporine sind hoch selektive und gleichzeitig sehr effiziente Wasserkanäle. Bis zu $3 \cdot 10^9$ Wassermoleküle pro Sekunde werden von humanem AQP1 aus Erythrozyten geleitet (van Hoek und Verkman, 1992; Zeidel *et al.*, 1992). Diese Rate ist 30 x höher als die von KcsA-Kaliumkanälen, die mit 10^8 Kaliumionen pro Sekunde zu den effizientesten Kanälen zählen (Morais-Cabral *et al.*, 2001). Dabei wird die Richtung des Wasserflusses einzig durch den vorherrschenden osmotischen Gradienten bestimmt, so dass Wasser in beiden Richtungen durch ein Aquaporin strömen kann.

Aquaporine gehören zur Familie der *major intrinsic proteins* (MIP), welche als Membranproteine Poren in der Zellmembran bilden und Wasser und kleine Solute leiten (Reizer *et al.*, 1993; Maurel *et al.*, 1994).

MIP lassen sich funktionell in Aquaporine und Aquaglyceroporine einteilen: Orthodoxe Aquaporine lassen ausschließlich Wasser passieren, während Aquaglyceroporine neben Wasser auch für kleine Solute wie Glycerol, Harnstoff und Ammoniak durchlässig sind (Zardoya, 2005). Die humanen Aquaporine 0, 1, 2, 4 und 5 sind wasserselektiv, AQP6 und AQP8 gehören aufgrund ihrer Aminosäuresequenz zu dieser Gruppe. Die Aquaporine 3, 7, 9 und 10 gehören zu den Aquaglyceroporinen

(Gonen und Walz, 2006). Die sogenannten Superaquaporine 11 und 12 bilden eine eigene Subfamilie und wurden bislang kaum charakterisiert (Ishibashi, 2006).

Im Laufe der Evolution haben sich die Aquaporine strukturell nur wenig verändert. Die heute bekannten Isoformen weisen große Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz auf (Park und Saier, 1996).

1.2 *Pharmazeutische Relevanz*

Aquaporine sind im menschlichen Organismus ubiquitär vorhanden, die dreizehn Isoformen sind dabei spezifisch verteilt. Sie sind sowohl an der zentralen Wasserregulation des Körpers über Harnkonzentrierung und Einstellung der Blutosmolarität als auch lokal an der Wasserhomöostase z.B. in Lunge, Auge, Gehirn, Innenohr und Haut beteiligt (Jung *et al.*, 1994a; Nielsen *et al.*, 1996; Hamann *et al.*, 1998; Agre *et al.*, 2002; Beitz *et al.*, 2003). Neben der zellspezifischen liegt teilweise auch eine entwicklungsabhängige Expression der Aquaporine vor: So ist AQP4 postnatal zur besseren Wasserresorption in der Lunge des Säuglings überexprimiert (Yasui *et al.*, 1997; Borok und Verkman, 2002).

Tabelle 1.1 gibt eine Übersicht über die fundamentalen Aufgaben der Aquaporinfamilie in der Physiologie des menschlichen Körpers.

1. Einleitung

Isoform	Lokalisation	Aufgabe	bekannte Krankheiten
AQP0	Augenlinse	Linsentransparenz	Katarakt
AQP1	Niere, Erythrozyten, Gehirn, Auge, Lunge, Endothelien, Speicheldrüsen	Harnkonzentrierung, Blutosmolarität, Liquorproduktion, Augeninnendruck, Linsentransparenz, Zellmigration	Katarakt, Tumore, Sjögren-Syndrom, Morbus Alzheimer (?)
AQP2	Niere, Innenohr	Harnkonzentrierung	nephrogener Diabetes insipidus, Enuresis nocturna, kongestive Herzinsuffizienz, Morbus Menière
AQP3	Niere, Lunge, Auge, Kolon, Haut	Harnkonzentrierung, Lungen-/Hautbefeuchtung, Zellproliferation, Wundheilung	Hauttumore
AQP4	Gehirn, Niere, Lunge, Auge	zerebrale Wasserhomöostase, Harnkonzentrierung, Lungenbefeuchtung, Augeninnendruck	Hirnödem, Neuromyelitis optica
AQP5	Speichel-/Tränen-drüsen, Auge, Lunge	Drüsensekretion, Kornea-Wundheilung	Sjögren-Syndrom, erhöhte Sepsisletalität
AQP6	Niere	Säuresekretion (?)	
AQP7	Adipozyten, Spermien, Niere	Fettmetabolismus, Spermienbeweglichkeit, renale Glycerolreabsorption	Adipositas, Unfruchtbarkeit
AQP8	Spermien, Leber, Pankreas	H_2O_2 -Transport (?)	
AQP9	Leber	Fettmetabolismus	Adipositas, Arsenentgiftung (?)
AQP10	Gastrointestinaltrakt		
AQP11	Niere	Nierenentwicklung (?)	ko-Maus: polycystische Niere
AQP12	Pankreas		

Tabelle 1.1: 13 humane Aquaporine: Lokalisation, Funktion und assoziierte Krankheiten
 (Beitz und Schultz, 1999; Borgnia et al., 1999; Song et al., 2001; Agre et al., 2002; Verkman, 2002; King et al., 2004; Morishita et al., 2005; Nielsen et al., 2007; Wingerchuk et al., 2007; Engel et al., 2008; Misawa et al., 2008; Verkman et al., 2008; Bhattacharjee et al., 2009; Boury-Jamot et al., 2009; Carbrey und Agre, 2009; Chepelinsky, 2009; Delporte, 2009; Ho et al., 2009; Ishibashi, 2009; Kwon et al., 2009; Maeda et al., 2009; Sohara et al., 2009; Takeda und Taguchi, 2009; Verkman, 2009b; Verkman, 2009a; Yasui, 2009; Zador et al., 2009)

Entgegen der Annahme, dass das prototypische AQP1 wegen seiner zahlreichen Funktionen im menschlichen Körper essenziell sei, wurden durch das Fehlen des Colton-Blutgruppenantigens einige Menschen identifiziert, die Mutationen im AQP1-Gen aufweisen und in der Folge ohne AQP1 leben können (Mathai *et al.*, 1996; King *et al.*, 2001). Obwohl in Colton-positiven Individuen beispielsweise die Wasser-rückresorption durch AQP1 im proximalen Tubulus der Niere ca. 80% des Primär-harnvolumens beträgt, weisen diese Colton-negativen Menschen kaum klinische Symptome auf; unter Durststress findet sich jedoch eine reduzierte Fähigkeit zur Harnkonzentrierung und ein Anstieg der Blutosmolarität. AQP1 knockout-Mäuse leiden dagegen unter Polyurie, und ihre Urinosmolarität ist bereits unter Normalbedingungen gering (Ma *et al.*, 1998; Schnermann *et al.*, 1998).

Träger von Mutationen im AQP2-Gen sind klinisch schwer betroffen: AQP2 liegt in den Hauptzellen des Sammelrohres der Niere in intrazellulären Vesikeln gespeichert vor. Es wird nach Stimulation durch Vasopressin in die apikale Zellmembran eingebaut und sorgt für die Endkonzentrierung des Harns (Nielsen *et al.*, 1995). Wird das *trafficking* zur apikalen Membran durch Mutation im AQP2-Gen verhindert, führt dies zu nephrogenem Diabetes insipidus mit hohen Wasserverlusten (Kamsteeg *et al.*, 2003; Loonen *et al.*, 2008).

Aquaporine spielen auch eine Rolle im Wachstum von Tumoren: Sie fördern die Tumorangiogenese sowie die Migration und Proliferation von Tumorzellen. AQP1 knockout-Mäuse zeigen eine eingeschränkte Angiogenese durch reduzierte endothiale Zellmigration. AQP3 knockout-Mäuse sind sogar resistent gegenüber der Hauttumorbildung (Verkman *et al.*, 2008).

Die vielen Funktionen der Aquaporine und ihre Rolle bei Krankheiten, bei denen Wasserbewegungen über Zellmembranen eine Rolle spielen, könnten klinisch genutzt werden durch Modulation der Aquaporin-Expression und -Funktion. So könnten Aquaporine Targets für die Entwicklung neuer Medikamente mit Indikationsgebieten wie Hirnödem, Schlaganfall, Beeinflussung der Diurese, kongestive Herzinsuffizienz, Glaukom, Adipositas und Krebs darstellen (Chakrabarti *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Verkman, 2009b).

Die neue Arzneistoffgruppe der Vaptane hat AQP2 als indirektes Target. Als Antagonisten des V₂-Rezeptors in der Niere hemmen Vaptane den Vasopressin vermittelten Einbau von AQP2 in die Plasmamembran und führen so zu einer Aquarese (Gross *et al.*, 2009; Oghlakian und Klapholz, 2009). Tolvaptan ist in Europa seit August 2009

zur Behandlung der Hyponatriämie bei SIADH (Syndrom der inadäquaten ADH-Ausschüttung) zugelassen.

Um Aquaporinfunktionen in Zukunft möglicherweise direkt beeinflussen zu können, müssen die Kanäle zunächst auf molekularer Ebene verstanden werden.

1.3 Struktur der Aquaporine

Aquaporine bilden Homotetramere, in denen jede der vier Untereinheiten eine eigenständige Wasserpore enthält (Smith und Agre, 1991; Walz *et al.*, 1994). Dies unterscheidet Aquaporine von Ionenkanälen, bei denen die Untereinheiten eine einzige zentrale Pore umgeben.

Ein Aquaporinmonomer besteht aus sechs transmembranären Bereichen mit fünf verbindenden Schleifen A bis E (s. Abb. 1.2) (Engel *et al.*, 2000). N- und C-Terminus liegen im Zytoplasma. Dabei ist die carboxy- gegenüber der aminoterminalen Hälfte um 180° gekippt (Preston *et al.*, 1994), so dass die zweite Hälfte der Struktur eine invertierte Wiederholung der Topologie der ersten darstellt. Die Sequenzähnlichkeit beider Hälften spricht dafür, dass diese evolutionär aus einer internen Genduplikation eines drei-transmembranären Segments entstanden sind (Pao *et al.*, 1991; Park und Saier, 1996). Jede Sequenzhälfte enthält ein Asparagin-Prolin-Alanin (NPA)-Motiv an den positiven Enden der Halbhelices B und E, welches innerhalb der Aquaporinfamilie hoch konserviert ist (Ren *et al.*, 2001; Sui *et al.*, 2001).

Die beiden Halbhelices B und E lagern sich von entgegengesetzten Seiten in der Membran zu einer zusätzlichen „Pseudo-siebten Transmembranspanne“ zusammen (Unger, 2000) und interagieren durch van der Waals-Kräfte zwischen den beiden Prolinresten der NPA-Region (Murata *et al.*, 2000). Diese beiden Halbhelices bilden die schmale Wasserpore (*hourglass*-Modell) (Jung *et al.*, 1994b; Braun *et al.*, 2000).

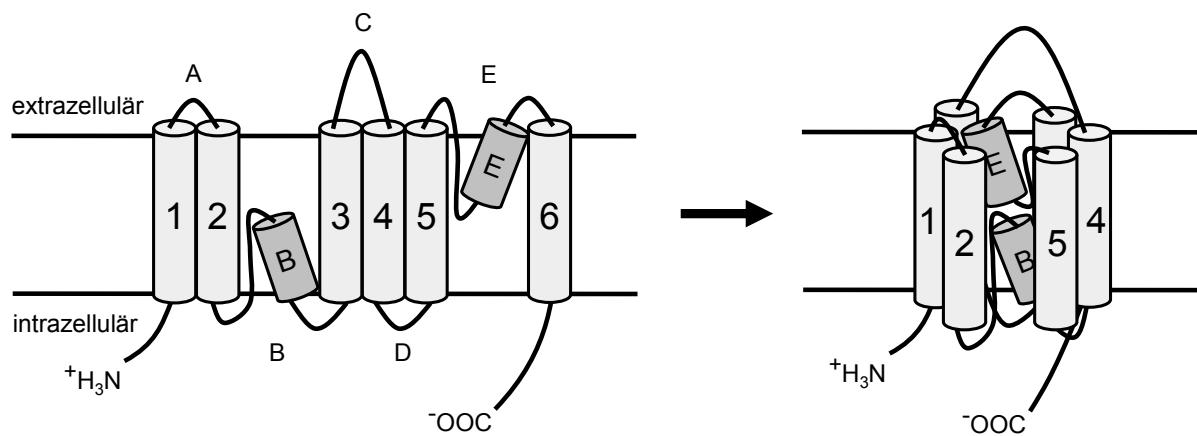


Abbildung 1.2: Schema der Topologie eines Aquaporinmonomers (hourglass-Modell). Die Helices sind als Zylinder dargestellt.

Links: interne Wiederholung eines drei-transmembranären Segments
Rechts: Die Halbhelices B und E lagern sich in der Membran zusammen und bilden eine „Pseudo-siebte Transmembranspanne“.

Einige Aquaporine besitzen benachbart zum zweiten NPA-Motiv ein Cystein (C189 bei AQP1), dessen Sulfhydrylgruppe in die Pore ragt. Sie können daher durch Sulfidbildung mit Quecksilberionen blockiert werden (Preston *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1993).

1.4 Selektivitätsmechanismen von Aquaporinen

Wie erreichen Aquaporine strikte Selektivität für Wasser bei so hoher Flussrate?

Aquaporine bilden enge, hydrophobe Wasserporen, die so schmal sind, dass Wassermoleküle in einer sogenannten *single-file*-Anordnung, also in einer Reihe hindurchtreten müssen (Kruse *et al.*, 2006; Wang und Tajkhorshid, 2007). Dabei reduziert das Protein den Energieaufwand für den Durchtritt eines Wassermoleküls, indem es Ersatzbindungen zur Verfügung stellt: Eine Leiter von Carbonylsauerstoffen als Wasserstoffbrückenakzeptoren durchzieht den Kanal. Diese gewährleisten die optimale Koordination der Wassermoleküle (Wu und Beitz, 2007).

Zwei hoch konservierte Engstellen sorgen für die Selektivität im Sinne eines Zwei-Stufen-Filters: die NPA-Region im Zentrum des Kanals und die aromatische/Arginin (ar/R)-Region an der extrazellulären Porenöffnung (s. Abb. 1.3).

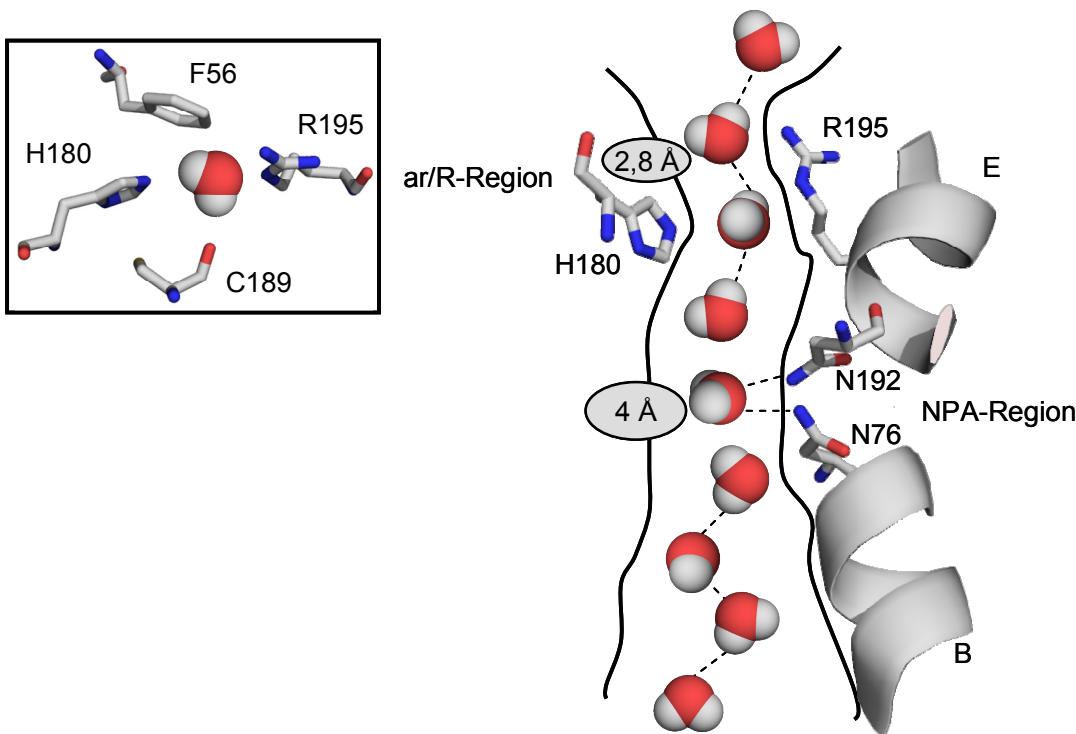


Abbildung 1.3: AQP1-Modell mit den beiden Engstellen, der ar/R-Region am Poreneingang und der NPA-Region in der Porenmitte. Erkennbar ist die bipolare Orientierung der Wasserkette und die Isolation des zentralen Wassermoleküls.

Detailansicht im Kasten links: die vier Aminosäuren der ar/R-Region (nach PDB #1j4n des bovinen AQP1; Nummerierung der Reste analog AQP1 aus der Ratte; Erstellung der Abbildung mit Hilfe von Pymol)

NPA-Region

Die NPA-Region mit einem Durchmesser von 4 Å wird von den endständigen Aminosäuren der positiven Enden der Halbhelices B und E gebildet. Dabei sind Prolin und Alanin zu einem gewissen Grad austauschbar, während die Asparagine bislang als essenziell und invariabel galten (Zardoya, 2005). Die positiven Enden der beiden Halbhelices bewirken eine Rotation des passierenden Wassermoleküls (Walz *et al.*, 2009). Dieses wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zu den Asparaginen isoliert und verlässt die Engstelle um hundertachtzig Grad gedreht. Der NPA-Region wird neben dem Größenausschluss eine wichtige Filterfunktion für Protonen zugeschrieben.

ar/R-Region

Die ar/R-Region am Poreneingang ist noch enger als die NPA-Region. Der Durchmesser beträgt für wasserspezifische Aquaporine 2,8 Å und entspricht damit dem eines Wassermoleküls (Agre und Kozono, 2003). Sie wird in AQP1 von den vier Aminosäuren Arginin, Phenylalanin, Histidin und Cystein gebildet (s. Abb. 1.3) (Beitz *et al.*, 2009). Dabei trägt das Cystein vor allem mit dem Carbonylsauerstoff der Peptidbindung zur ar/R-Region bei. Das Histidin begrenzt in wasserselektiven Aquaporinen den Porendurchmesser und besitzt bei neutralem pH eine partiell positive Ladung. Das Arginin ist in fast allen Mitgliedern der Aquaporinfamilie konserviert (Kozono *et al.*, 2002). Es trägt mit seiner positiven Ladung zur Abstoßung von Hydroxoniumionen bei (Beitz *et al.*, 2006). In Aquaglyceroporinen wie z.B. GlpF aus *E. coli* ist die Konstriktion für die Glycerolpassage mit 3,4 Å weiter und hydrophober. Das Histidin ist hier durch Glycin ausgetauscht und anstelle des Cysteins findet sich eine zweite aromatische Aminosäure (Stroud *et al.*, 2003).

Folglich hat die ar/R-Region zwei restriktive Funktionen: Größenselektion und elektrostatische Abstoßung. Ein Wasser- bzw. Solutmolekül passt sich exakt in den Durchmesser der Konstriktion ein, und das Arginin sichert die Abstoßung von positiven Ladungen.

Anionenausschlussmechanismen von Aquaporinen wurden bisher in der Literatur wenig diskutiert. In molekulardynamischen Simulationen konnten zwei Anionenbarrieren ober- und unterhalb der NPA-Region berechnet werden (de Groot *et al.*, 2003; Ko *et al.*, 2008). Diese werden durch die Carbonylsauerstoffe der Porenwandung gebildet (Sui *et al.*, 2001; de Groot *et al.*, 2003), eventuell sind daran aber auch die negativen Pole der Halbhelices B und E beteiligt (Jensen *et al.*, 2005).

Eine Ausnahme stellt AQP6 dar. Dieses bislang einzige Ionen leitende Aquaporin ist kaum permeabel für Wasser, transportiert jedoch als Anionenkanal Nitrat und Halogenidionen. Auch die Lokalisation in intrazellulären Vesikelmembranen von Säure sezernierenden interkalierenden Zellen des Sammelrohres und die Aktivierung durch Quecksilberionen und niedrigen pH-Wert unterscheidet AQP6 von den übrigen Aquaporinen (Yasui *et al.*, 1999; Ikeda *et al.*, 2002).

1.5 Protonenausschluss in Aquaporinen

Bei einer Kopienzahl (in Erythrozyten) von etwa 200 000 Aquaporinmonomeren pro Zelle (Denker *et al.*, 1988; Zeidel *et al.*, 1994), das sind 10 bis 100 mal mehr als bei typischen Ionenkanälen, ist ein wirkungsvoller Ausschluss von Protonen durch jedes einzelne Molekül Voraussetzung für die Aufrechterhaltung des optimalen intrazellulären pH-Wertes. Dieser ist beispielsweise für sämtliche Enzymaktivitäten relevant. In Pflanzen und Bakterien wird zudem das Membranpotenzial durch Protonen bestimmt (Agre und Kozono, 2003), und in fast allen höheren Lebewesen ist der Protonengradient über der inneren Mitochondrienmembran die primäre Energiequelle für die Synthese von ATP (Mitchell, 1961).

Im Menschen wirken Aquaporine nicht nur auf die zelluläre, sondern auch auf die systemische Protonenhomöostase. Da in der Niere 99% des Primärharns unter Ausschluss der Protonen durch Aquaporine rückresorbiert wird, verhindern diese nicht nur eine Dehydrierung, sondern auch eine Azidose (Agre und Kozono, 2003).

Der Protonenausschluss stellt ganz besondere Anforderungen an das Aquaporin, denn diese Fähigkeit steht in krassem Gegensatz zum freien Fluss von Protonen, die sich entlang von Wasserketten in Protonenkanälen bewegen (Pomes und Roux, 1996). Ketten von Wassermolekülen können nämlich exzellent Protonen leiten, da sich die positive Ladung von Protonen als H_3O^+ durch Austausch von Wasserstoffbrückenbindungen entlang der Wasserkette bewegt (s. Abb. 1.4). Dieses „Klappen“ von Wasserstoffbrückenbindungen wird als Grotthuss-Mechanismus bezeichnet (Decoursey, 2003; Wraight, 2006).

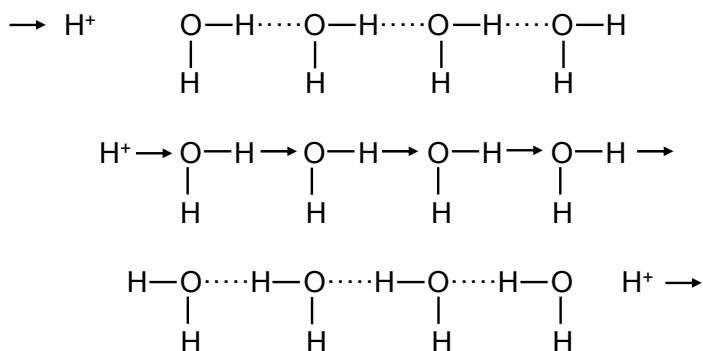


Abbildung 1.4: Schema des Grotthuss-Mechanismus: Die Ladung eines Protons kann durch „Klappen“ von Wasserstoffbrückenbindungen entlang einer Wasserkette transportiert werden (Gonen et al., 2005).

Dieses Prinzip findet man in verschiedenen Protonenkanälen. Prototypisch dafür ist Gramicidin A. Das kleine antibiotisch wirksame Peptid aus *Bacillus brevis* formt Poren mit einem Durchmesser von 4 Å, die eine vergleichbar hohe Wasserpermeabilität wie AQP1 aufweisen und zusätzlich selektiv sind für monovalente Kationen (Wallace, 1986; Zeidel et al., 1992; de Groot und Grubmuller, 2001; Portella et al., 2007). Hydrophobe Seitenketten sind nach außen gerichtet, während der Peptidrücken nach innen zeigt. Die hohe Protonenpermeabilität wird durch die Ladungsverschiebung über das Klappen von Wasserstoffbrückenbindungen erreicht (*hop*). Nach dem Durchtritt des Protons wird die Wasserkette reorganisiert (*turn*) (Pomes und Roux, 2002).

Der virale Protonenkanal M2 des Influenza A Virus spielt im Infektionsprozess eine wichtige Rolle für das *uncoating*. Im Gegensatz zu Gramicidin A ist dieser hochselektiv für Protonen. Es wird hier ein Protonentransfer über eine Wasserkette via Grotthuss-Mechanismus diskutiert, wobei diese in einer Engstelle unterbrochen wird. Dort wird über Protonierung bzw. Deprotonierung eines Histidinrestes die Selektivität gegenüber anderen Kationen gesichert (Chen et al., 2007b; DeCoursey, 2008).

Da Aquaporine von Natur aus Wasserketten enthalten, müssen sie spezifische Mechanismen für den Protonenausschluss besitzen, die wahrscheinlich in den konservierten Bereichen zu finden sind.

Wie in Abbildung 1.3 gezeigt, ist das zentrale Wassermolekül über Wasserstoffbrückenbindungen mit beiden Asparaginen der NPA-Region koordiniert und somit von seinen Nachbarmolekülen isoliert. Es kann lediglich als Wasserstoffbrückendonorator dienen, aber nicht als Akzeptor für die benachbarten Wassermoleküle. Hydro-

phobe Reste an der gegenüberliegenden Wand der Engstelle verhindern dabei ein alternatives Bindungsmuster. Das von den beiden Halbhelices ausgehende elektrostatische Feld bewirkt eine bipolare Anordnung der Wassermoleküle im Kanal. In der Kristallstruktur von AqpZ aus *E. coli* wurde dies bestätigt. Die Wassermoleküle ober- und unterhalb der zentralen Konstriktion sind um hundertachtzig Grad gegeneinander verdreht und zeigen jeweils mit ihren Sauerstoffatomen zur Porenmitte. Das zentrale Wassermolekül ist mit dem Sauerstoffatom zu den Helices B und E ausgerichtet (Savage et al., 2003). In der Kristallstruktur von AQP1 aus dem Rind konnte gar keine geeignete Wassermolekulkette detektiert werden: Wassermoleküle wurden an vier Stellen lokalisiert, und lediglich die mittleren beiden Moleküle stehen dicht genug, um Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden (Sui et al., 2001).

Somit ist in Aquaporinen die Konstellation anders als in Gramicidin A mit einer uniformen Ausrichtung der Moleküle in der Wasserkette. Es wurde postuliert, dass dieser Bruch der Wassermolekulkette den Grotthuss-Mechanismus verhindert und damit die Protonenbarriere in Aquaporinen darstellt (Murata et al., 2000). Allerdings konnte dieses Modell inzwischen widerlegt werden, wie im Folgenden dargelegt.

Experimentelle Daten zum Protonenausschluss in Aquaporinen

Durch Mutation des Arginins zum Valin (AQP1 R195V) und zusätzlich des Histidins zum Alanin (AQP1 H180A/R195V) in der ar/R-Region wurden die ersten Aquaporine mit Protonenleck generiert (Beitz et al., 2006). Deren Protonenpermeabilität ist aber sehr gering, um den Faktor 10^3 bis 10^4 kleiner als bei typischen Protonenkanälen.

Die Protonen leitenden Mutanten wurden in vergleichenden *patch clamp*-Untersuchungen mit H_2O und D_2O getestet. Die Mobilität von Deuteronen beträgt nur zwei Drittel derer von Protonen, während die Diffusionsgeschwindigkeit von D_3O^+ und H_3O^+ ähnlich ist (DeCoursey und Cherny, 1997). Im Ergebnis fand sich kein Isotopeneffekt, was einen Protonentransport über den Grotthuss-Effekt unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Durch die Mutationen in der ar/R-Region wurde die Porenfläche im Vergleich zu AQP1-Wildtyp dreifach (AQP1 R195V) bzw. siebenfach (AQP1 H180A/R195V) vergrößert und durch Entfernung positiver Ladungen gleichzeitig die Polarität reduziert. Die Mutanten wurden so auch für Ammoniak und Methylamin permeabel, AQP1 H180A/R195V zusätzlich für Harnstoff. Dies zeigt, dass in der ar/R-Region eine Selektion nach Größe und Polarität stattfindet.

Theoretische Modelle zum Protonenausschluss in Aquaporinen

Die Protonen-/Kationenfiltermechanismen von Aquaporinen sind Bestandteil von zahlreichen theoretischen Arbeiten überwiegend auf der Basis von molekulardynamischen Simulationen. Die Autoren beschreiben übereinstimmend eine Energiebarriere mit maximaler Wirkung im Zentrum des Kanals, die den Durchtritt von Kationen unter physiologischen Verhältnissen behindert. Als Ursache für diese Barriere werden vor allem zwei Mechanismen diskutiert:

1. Desolvatationseffekt: Der Energieaufwand für die notwendige partielle Ablösung der Solvathülle des Ions beim Durchtritt durch den engen, eher hydrophoben Kanal und die fehlende elektrostatische Stabilisierung stellen eine Energiebarriere dar. Einige Autoren sehen darin den Hauptgrund für den Protonenausschluss (Burykin und Warshel, 2003; Kato *et al.*, 2006), andere vermuten hier einen Teilbeitrag zum Protonenfilter (Chakrabarti *et al.*, 2004). Ko *et al.* haben diesen Effekt auch für Natriumionen beobachtet, sehen darin jedoch ebenfalls nur einen Teil des Kationenfilters (Ko *et al.*, 2008).

2. Bipolares Feld: Durch die positiven Enden der Halbhelices B und E in der NPA-Region resultiert ein elektrostatisches Feld im Zentrum des Kanals, das den Hauptprotonenfilter darstellen könnte (de Groot *et al.*, 2003; Chakrabarti *et al.*, 2004; Phongphanphanee *et al.*, 2008). Ko *et al.* unterstützen diesen Mechanismus als wichtigsten Faktor für den Ausschluss von Natriumionen (Ko *et al.*, 2008). Demgegenüber schließen Burykin *et al.* sowie Kato *et al.* die elektrostatischen Eigenschaften der Helices B und E als Hauptgrund für die elektrostatische Barriere explizit aus (Burykin und Warshel, 2003; Kato *et al.*, 2006).

Zusätzlich werden weitere Einflüsse auf den Protonenausschluss diskutiert, deren wichtigster ein additiver Effekt der ar/R-Region sein könnte:

Protonen werden durch die positive Ladung des Arginins bzw. zusätzlich des Histidins in AQP1 in der ar/R-Region elektrostatisch abgestoßen. Phongphanphanee *et al.* sehen darin den Grund für einen stärkeren Filter in AQP1 im Vergleich zu GlpF (Phongphanphanee *et al.*, 2008). Ilan *et al.* bestätigen diese zusätzliche Barriere, schreiben ihr jedoch eine Filterfunktion für andere Kationen zu (Ilan *et al.*, 2004).

1. Einleitung

Zwei Autoren sprechen der ar/R-Region eine Protonenfilterfunktion ausdrücklich ab (Chakrabarti *et al.*, 2004; Jensen *et al.*, 2005).

Möglicherweise wirken beim Protonenausschluss alle drei Effekte zusammen: Die energetische Barriere durch den Desolvatationseffekt, die elektrostatische Abstößung in der ar/R-Region und das Dipolmoment der NPA-Region (Chen *et al.*, 2006).

Die Vermeidung eines Grotthuss-Effekts durch Isolation des zentralen Wassermoleküls an den Asparaginen der NPA-Region sowie durch die bipolare Anordnung der Moleküle im Kanal spielt in der aktuellen Diskussion keine Rolle mehr. Zwar scheint dieser Effekt aufzutreten, jedoch trägt er in Anbetracht der deutlich mächtigeren Energiebarriere um die NPA-Region nicht nennenswert zum Protonenausschluss bei (Burykin und Warshel, 2003; de Groot *et al.*, 2003; Chakrabarti *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2006). Möglicherweise ist die bipolare Orientierung der Wassermoleküle auch nur eine Folge des elektrostatischen Feldes in der Pore (de Groot *et al.*, 2003).

Einige Autoren beeinflussen in ihren Computermodellen die vermuteten Hauptfiltermechanismen mit simulierten Mutationen.

In der Frage, wie diese Mutationen mit dem gleichen Ziel *in vivo* umzusetzen wären, sehen z.B. Kato *et al.* große Schwierigkeiten. Es sei fraglich, ob man generell die Passage von Protonen durch ein Aquaporin ermöglichen könne. Eine Leitfähigkeit für Protonen setze eine umfassende Veränderung der gesamten Porenwandung durch Einführung von Hydroxylgruppen voraus, was ohne Faltungsprobleme des Proteins kaum möglich wäre (Kato *et al.*, 2006).

Chakrabarti *et al.* sind hier anderer Meinung: Um den von ihnen vermuteten Hauptfiltermechanismus *in vivo* zu überprüfen, schlagen sie vor, durch Mutation von Asparagin nach Aspartat in der NPA-Region das Dipolmoment zu schwächen und damit möglicherweise ein Protonenleck zu schaffen (Chakrabarti *et al.*, 2004).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Der molekulare Ionenausschlussmechanismus der Aquaporine ist trotz intensiver theoretischer Forschungsarbeit und ersten experimentellen Ergebnissen noch nicht vollständig geklärt. Von besonderem Interesse ist der Protonenausschluss: Eine Beteiligung der ar/R-Region daran scheint sicher, doch der Hauptprotonenfilter wird auf der Basis von Simulationen weiterhin im Bereich der NPA-Region vermutet.

Die vorliegende Arbeit verfolgt das Ziel, den Protonenfilter der Aquaporine experimentell zu charakterisieren. Durch gezielte Mutationen soll versucht werden, das Dipolmoment der beiden Halbhelices in der NPA-Region durch Einführung von ein oder zwei Aspartaten anstelle der hoch konservierten Asparagine zu schwächen oder zu neutralisieren. Auf diese Weise würden die Theorien zur Bedeutung der Dipolwirkung für den Protonenausschluss experimentell überprüft. Zusätzlich sollen Mutanten generiert werden mit dem Ziel, die Koordination des zentralen Wassermoleküls in der Mitte der Pore zu beeinflussen, um deren Anteil am Kationenausschluss bzw. an der Verhinderung eines Grotthuss-Mechanismus zu klären. Gleichzeitig wird die Frage nach der generellen Umsetzbarkeit von Mutationen in dieser hoch konservierten und möglicherweise für die Proteinfaltung wichtigen Region überprüft.

Um die gefundenen Ergebnisse mit den früheren Arbeiten in Relation zu setzen, sollen die neuen Mutationen in der NPA-Region in die Protonen leitenden Mutanten der ar/R-Region eingeführt werden.

1. Einleitung

2 Material

2.1 Enzyme, Kits und Chemikalien

Agfa-Gevaert, Mortsel (Belgien)

G153 developer, G354 fixer

Ambion, Austin (USA)

mMESSAGE mACHINE® RNA Transcription Kit

AppliChem, Darmstadt

n-Octyl- β -D-glucopyranosid

Biontex Laboratories, Martinsried/Planegg

Metafectene™

Becton Dickinson, Heidelberg

Difco™ Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium (YNB), Bacto™

Peptone, Bacto™ Tryptone, Bacto™ Yeast Extract, Bacto™ D-Galactose, Bacto™

Agar

Biochrom, Berlin

Dulbecco's MEM, Trypsin/EDTA Lösung 10x, Fetales Kälberserum, Penicillin,

Streptomycin

Bio-Rad, München

Bio-Rad Protein Assay-Reagenz

ChemPur, Karlsruhe

Goldpartikel

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Prof. Bleich

Xenopus laevis Oozyten

Euroscarf, Frankfurt

Plasmid pYES260

Fermentas, St. Leon-Rot

Restriktionsendonukleasen, T4 DNA Ligase (5 U/ μ l), Klenow Fragment (10 U/ μ l),

λ -DNA, *PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus, RiboRuler™ RNA Ladder,*

2x RNA Loading Dye Solution

Fluka BioChemika, Basel (Schweiz)

Imidazol, myo-Inositol, L-Prolin, Trypanblaulösung

2. Material

GE Healthcare (Amersham Biosciences), Little Chalfont (UK)

Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing Kit, ECL Plus Western Blotting Detection System

Genaxxon Bioscience, Biberach

TEMED, SDS, GenAgarose LE, *Taq*-Polymerase (5U/ μ l), 10x PCR-buffer, dNTPs

Jackson Immuno Research Europe Ltd, Suffolk (UK)

Goat Anti-Mouse IgG

Macherey-Nagel, Düren

Nucleotrap®, Nucleobond® PC500

Merck, Darmstadt

DMSO, CertiPUR®, Titrisol® Salzsäure, Natriumhydroxid, Kaliumchlorid,

Natriumhydrogenphosphat

MP Biomedicals, Illkirch (Frankreich)

Ethidiumbromidtabletten

MWG-Biotech, Ebersberg

Oligonukleotide

National Diagnostics, Atlanta (USA)

SequaGel® XR, SequaGel® Complete Buffer Reagent

New England Biolabs, Frankfurt

Restriktionsendonukleasen

Oxoid, Basingstoke (UK)

Agar bacteriological

Peqlab Biotechnologie, Erlangen

peqGOLD Protein-Marker I, peqGOLD prestained Protein-Marker III

Promega, Madison (USA)

Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Kit

Quiagen, Hilden

Ni^{2+} -NTA Agarose

Roche, Mannheim

Collagenase A, *Rapid DNA Ligation Kit, Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets*

Roth, Karlsruhe

*Rotiphorese®-Gel 40, Roti®-Blue 5fach Konzentrat, Rotiphorese® Blau R,
alle hier nicht aufgeführten Chemikalien*

Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

monoklonaler Maus-Antikörper gegen AQP1 (sc-25287)

Sigma-Aldrich, München

Adenosinsulfat, APS, DNA-Natriumsalz Typ III von Lachssperma, L-Histidin, Lithiumacetat, L-Lysin, L-Tryptophan, Ludox[®] CL, Methylaminhydrochlorid, Mineralöl, 35% Polyacrylsäure, Polyethylenglycol 3350, Poly-L-Lysin, Subtilisin A, Succinylsäure, Urea

Stratagene, La Jolla (USA)

PfuTurbo[®] DNA-Polymerase AD, *Pfu* DNA Polymerase (2,5 U/μl)

Süd-Laborbedarf, Gauting

Hi Yield[®] PCR Clean-up & Gel-Extraction Kit

2.2 Geräte und Materialien

Adolf Wolf SANOclav, Bad Überkingen-Hausen

Sanoclav

Bandelin, Berlin

Ultraschallbad SONOREX RK 514

Beckmann Coulter, Krefeld

Optima[™] XL-80 K Ultrazentrifuge, Rotor 50.2 Ti

Bio-Rad, München

PowerPac200, Trans-Blot[®] SD semidry transfer cell

Cawo Photochemisches Werk, Schrobenhausen

Cawomat 2000 IR, ABS-Kassette

Clemens, Waldbüttelbronn

Dualblock Primus *advanced* HT2X und Primus 25 mit HT Manager Software

Edmund Bühler, Hechingen

Schüttler WS-10 und KL2

Eppendorf, Hamburg

BioPhotometer, Kühlzentrifuge Centrifuge 5415R

GFL, Burgwedel

Wasserbäder GFL[®] 1083

GE Healthcare (Amersham Biosciences), Little Chalfont (UK)

Hybond[™]-P PVDF Membrane (0,2 μm Porenweite), *Hyperfilm ECL*

2. Material

Gonotec, Berlin

Osmomat®

Heraeus Instruments, Osterode

Biofuge pico, Benches Hera *guard* und Hera *safe*, Brutschränke kelvitron®t und *function line*, Trockenschrank

Herolab, Wiesloch

Raytest IDA Image Documentation & Analysis

Hewlett-Packart, Böblingen

Scanjet G4050

H+P Labortechnik, Oberschleißheim

VARIOMAG MONO Magnetrührer

ika-Werke, Staufen

IKAMAG® RET-GS Magnetrührer

Infors, Bottmingen (Schweiz)

Brutschränke Infors HT Minitron

Kern&Sohn, Balingen

Feinwaage ABS 120-4

Labsystems, Vantaa (Finnland)

Bioscreen C

LEICA Microsystems, Wetzlar

Binokular MZ 6, konfokales Lasermikroskop TCS SP

LI-COR Biosciences, Bad Homburg

DNA Sequencer 4200 mit Auswertungssystem

Mettler-Toledo, Gießen

RAININ Classic™ Pipetten, PB3002-S DeltaRange® Waage

MWG-Biotech, Ebersberg

BaseMagIR V.4.2. Software

Nikon, Düsseldorf

Diaphot inverses Fluoreszenzmikroskop

Olympus, Hamburg

CK2/ULWCD 0.30 Mikroskop

Panasonic, Osaka (Japan)

CCTV Camera WV-CD 20

Peqlab Biotechnologie, Erlangen

PerfectBlue® vertikale Doppelgelsysteme *Twin S*, Heizblöcke

Pharmacia Biotech, Dübendorf (Schweiz)

Electrophoresis Power Supply-EPS 300

Sarstedt, Nümbrecht

Labor-Verbrauchsmaterialien jeglicher Art (Pipettenspitzen, Sterilfilter), auch für die Zellkultur

Savant Instruments, Farmingdale (USA)

Vakuumzentrifuge *DNA SpeedVac® DNA110*

Schleicher & Schuell, Dassel

Whatmanpapier 3MM

SCHOTT Instruments, Mainz

Digital-Labor-pH-Meter Lab 850

Scientific-Industries, Bohemia (USA)

Vortex Genie 2

SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation, Barsbüttel

Reinstwasseranlage

Superior, Marienfeld

Zählkammer Fuchs-Rosenthal *Bright-Line*

Techne, Burlington (USA)

Techne *DRI-Block®DB-2D*

Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

Multifuge 1S-R, *French Press Cell Disrupter* (FA-078), *French Press Zelle* (FA-032)

TILL Photonics, Gräfelfing

ratio imaging system mit TILLVision 3.3 software

VWR, Darmstadt

Plastik Swinney Filterhalter

World Precision Instruments, Berlin

Nanoliter-Injektor Nanoliter 2000, Glaskapillaren für Nanoliter 2000 (4878), *Fluoro-Dish™* (FD35PDL-100)

WTB Binder Labortechnik, Tuttlingen

Heißluftsterilisator, Brutschrank

Zeitz-Instrumente, München

DMZ-Universal Puller

2.3 Oligonukleotide (Primer)

Sequenzierprimer

Die Sequenzierprimer waren am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD 800 markiert.

Name	Sinn	Sequenz	Position	Beschreibung
T7	s	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG		pOG1, pYES2
T3	as	GTG TAA GTT GGT ATT ATG TAG		pOG1
MET	s	AGT AAA GCG TCT GTT AGA AAG G		pRS426MET
CYC	as	ATA GGG ACC TAG ACT TCA G		pRS426MET, pYES2
GFP/pHluorin s	s	CGA AAA GAG AGA CCA CAT	636-653	
GFP/pHluorin as	as	CCT TCA AAC TTG ACT TCA GC	347-328	

Mutageneserprimer

Das mutierende Codon ist fett gedruckt.

Name	Sinn	Sequenz	Position	Kurzbezeichnung
rAQP1 N76D s	s	GGT GCT CAC CTC GAC CCA GCG GTC ACA C	214-241	(1)
rAQP1 N76D as	as	G TGT GAC CGC TGG GTC GAG GTG AGC ACC	241-214	(2)
rAQP1 N192D s	s	CT GGC TGT GGG ATC GAC CCT GCC CGG TC	560-587	(3)
rAQP1 N192D as	as	GA CCG GGC AGG GTC GAT CCC ACA GCC AG	587-560	(4)
rAQP1 N192D R195V s	s	GGC TGT GGG ATC GAC CCT GCC GTG TCA TTT GGC	562-594	(5)
rAQP1 N192D R195V as	as	GCC AAA TGA CAC GGC AGG GTC GAT CCC ACA GCC	594-562	(6)
rAQP1 N76S s	s	GGT GCT CAC CTC AGC CCA GCG GTC ACA C	214-241	(7)
rAQP1 N76S as	as	G TGT GAC CGC TGG GCT GAG GTG AGC ACC	241-214	(8)
rAQP1 N76A s	s	GT GGT GCT CAC CTC GCC CCA GCG GTC ACA CTG G	212-244	(9)
rAQP1 N76A as	as	AG TGT GAC CGC TGG GGC GAG GTG AGC ACC ACT G	242-210	(10)

Name	Sinn	Sequenz	Position	Kurzbezeichnung
rAQP1 N192A s	s	T GGC TGT GGG ATC GCC CCT GCC CGG TCA TTT GG	561-585	(11)
rAQP1 N192A as	as	TGA CCG GGC AGG GGC GAT CCC ACA GCC AGT GTA G	588-554	(12)
hAQP1 N76D s	s	AGC GGC GCC CAC CTC GAC CCG GCT GTC ACA CT	211-242	(13)
hAQP1 N76D as	as	AG TGT GAC AGC CGG GTC GAG GTG GGC GCC GCT	242-211	(14)
hAQP1 H180A s	s	TC TCT GTA GCC CTT GGA GCC CTC CTG GCT ATT	521-552	(15)
hAQP1 H180A as	as	T GTA GTC AAT AGC CAG GAG GGC TCC AAG GGC TAC A	559-525	(16)
hAQP1 R195V s	s	TGT GGG ATT AAC CCT GCT GTG TCC TTT GGC TC	565-596	(17)
hAQP1 R195V as	as	T CAC CGC GGA GCC AAA GGA CAC AGC AGG GTT AAT	604-571	(18)
pYES2 10xHis rAQP1 Stop-Leu s	s	CAT CAC GGG ATC CAA GCT TTA TCC CAT ATG GCC A	(-27)-7	(19)
pYES2 10xHis rAQP1 Stop-Leu as	as	TTC GCT GGC CAT ATG GGA TAA AGC TTG GAT CCC GT	12(-23)	(20)

Klonierungsprimer

Die Schnittstelle ist fett gedruckt.

Name	Sinn	Sequenz	Position	Kurzbezeichnung
GFP (BamHI 426 F)	s	AA TAC AGG GTC GTC AGA TAC ATA GAT ACA ATT CTA TTA CCC CCA TCC ATA GGA TCC ATG AGT AAA GGA GAA GAA C	(-56)-19	(21)
GFP (BglII AQP1 r)	as	CT CCA GAA GAG CTT CTT CTT GAT TTC GCT GGC CAT AGA TCT AGT AGC AAT TGA CCT TTT GTA TAG TTC ATC CAT G	35-1 (rAQP1) + 21 b (<i>linker</i>) + 696-714 (pHluorin)	(22)
pHluorin Xhol s	s	GCA TGA CTC GAG ATG AGT AAA GGA GAA GAA CTT	(-12)-21	(23) pART7
pHluorin XbaI as	as	CGT ACT TCT AGA TTA TTT GTA TAG TTC ATC CAT	12 b + 717-697 (pHluorin)	(24) pART7
pHluorin EcoRI s	s	GAG AGA GAA TTC ATG AGT AAA GGA GAA GAA CTT	(-12)-21	(25) pART7
rAQP1 XbaI as	as	CGT ACT TCT AGA TCA TTT GGG CTT CAT CTC CAC	12 b + 810-790 (rAQP1)	(26) pART7

2. Material

Name	Sinn	Sequenz	Position	Kurzbezeichnung
pHluorin NotI s	s	GC ATG AGC GGC CGC ATG AGT AAA GGA GAA GAA CTT	(-14)-21	(27) pIRES
pHluorin EcoRI as	as	CGT ACT GAA TTC TTA TTT GTA TAG TTC ATC CAT	12 b + 717-697 (pHluorin)	(28) pIRES
rAQP1 EcoRI as	as	CGT ACT GAA TTC TCA TTT GGG CTT CAT CTC CAC	12 b + 810-790 (rAQP1)	(29) pIRES
10xHis HindIII/BamHI s	s	AG CTT ATG CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAC GG		(30) pYES2
10xHis HindIII/BamHI as	as	GAT CCC GTG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG CAT A		(31) pYES2

2.4 Plasmide

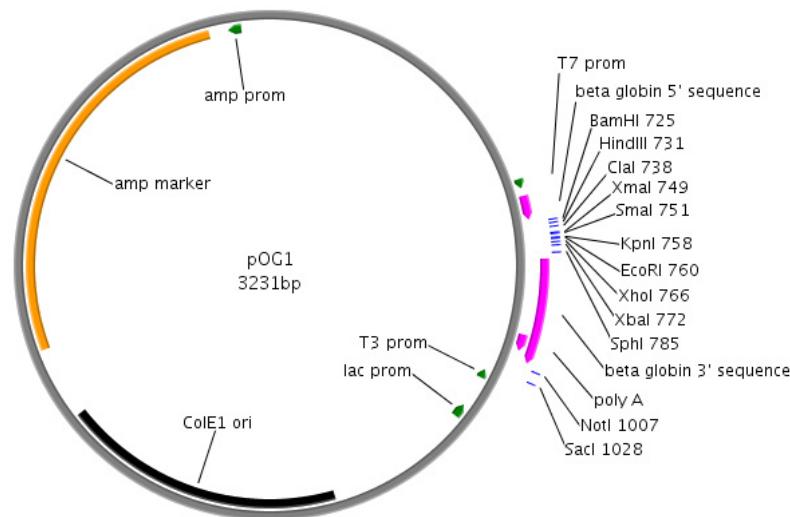


Abbildung 2.1: pOG1

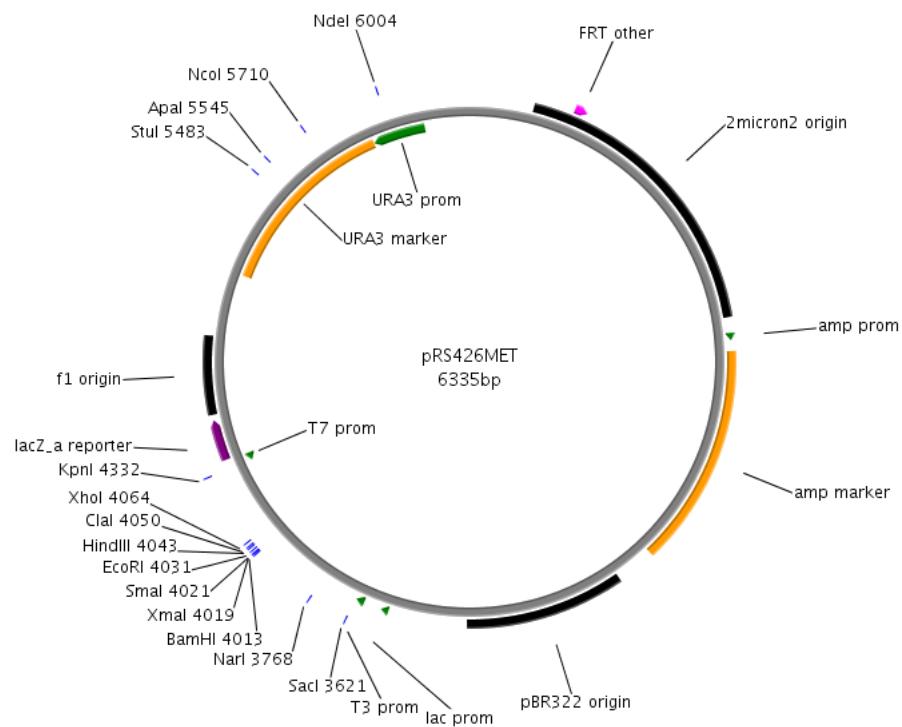


Abbildung 2.2: pRS426MET

2. Material

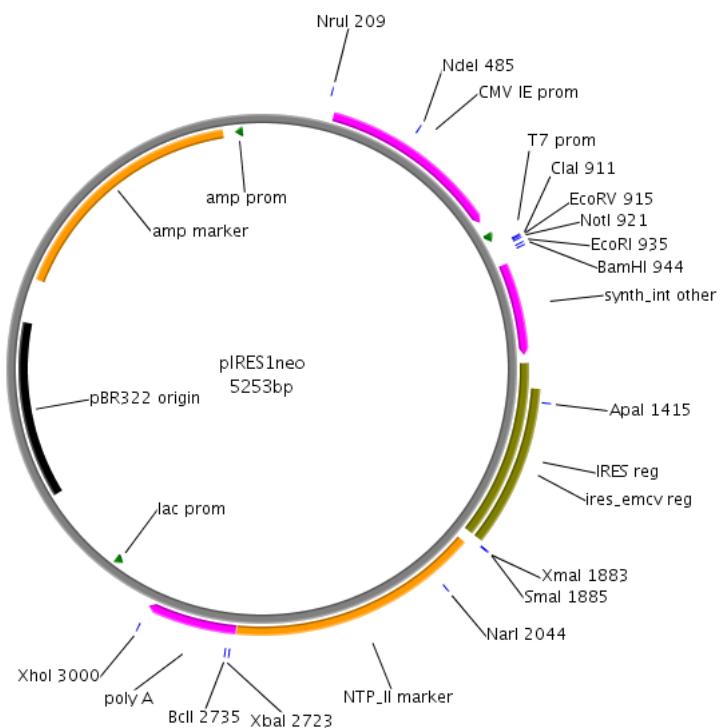


Abbildung 2.3: pIRES1neo

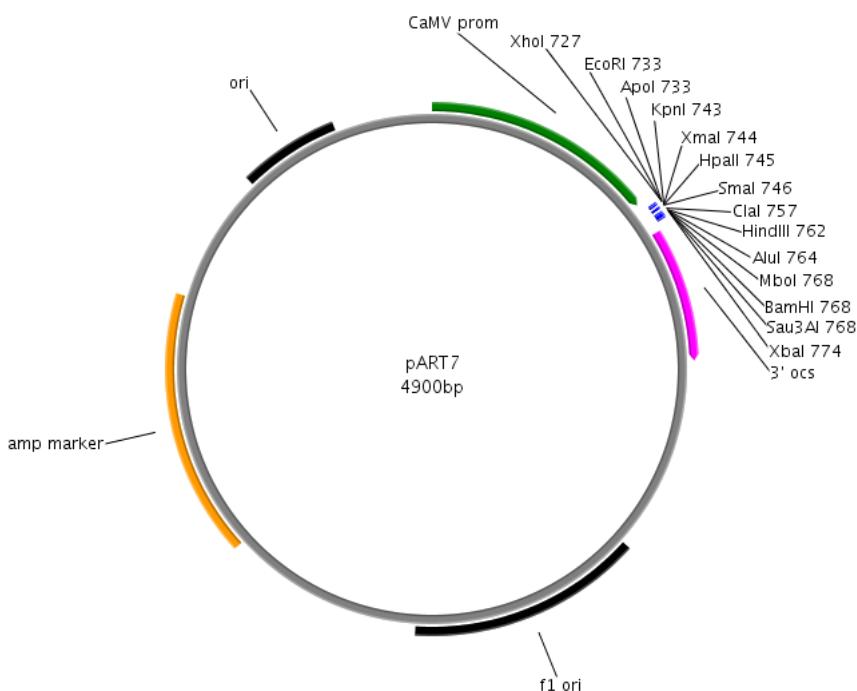


Abbildung 2.4: pART7

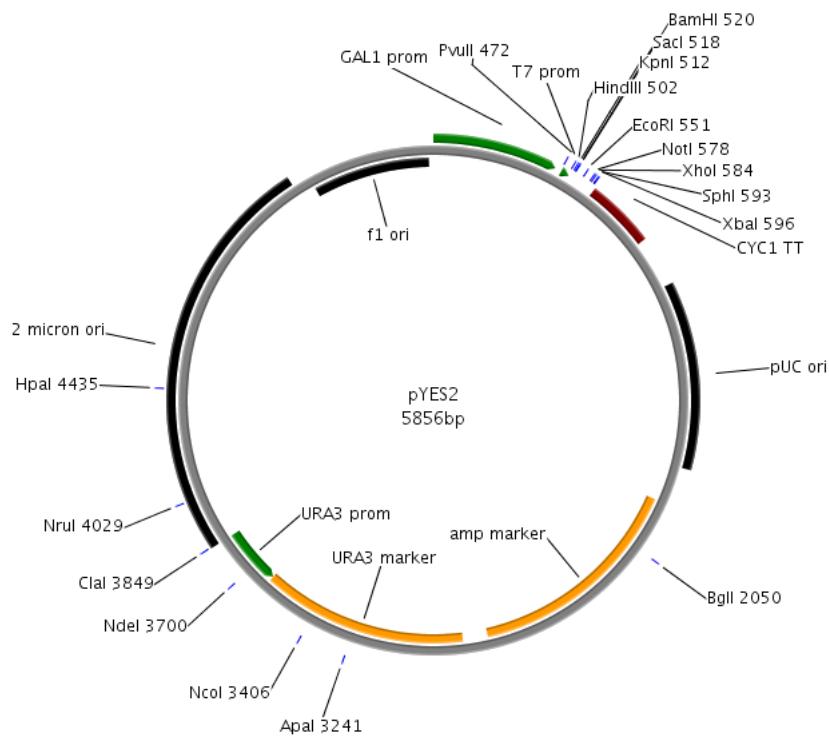


Abbildung 2.5: pYES2

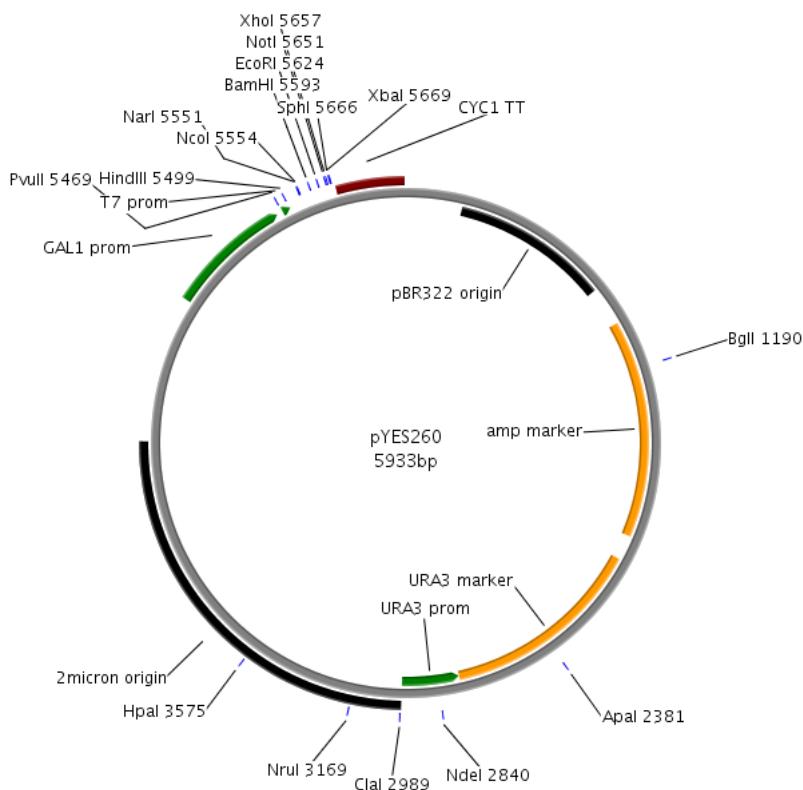


Abbildung 2.6: pYES260

2.5 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Name	Genotyp	Quelle
CY162	<i>MATa ura3-52 trk1Δ his3Δ200 his4-15 trk2Δ1::pCK64</i>	(Anderson et al., 1992)
MA5	<i>Mat a ade2 ura3 trp1 trkΔ::LEU2 trk2Δ::HIS3 ena1-4Δ::HIS3 nha1Δ::LEU2</i>	(Benito et al., 2004)
BY4742	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
BY4742Δfps1	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 fps1::KanMX4</i>	Euroscarf
31019Δfps1	<i>MAT a ura3 mep1Δmep2Δ::LEU mep3Δ::KanMX2 fps1Δ0</i>	Arbeitskreis Prof. Beitz

2.6 *Escherichia coli*-Stämme

Name	Genotyp	Quelle
DH5α	<i>F⁻ φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ⁻</i>	(Hanahan, 1983)
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>	Stratagene

2.7 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen für die molekularbiologischen Methoden, alle Nährmedien für *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Xenopus laevis* Oozyten sowie für die Zellkultur wurden sterilfiltriert (Porenweite 0,2 µm) bzw. autoklaviert (20 min, 121°C, 1 bar Überdruck).

2.7.1 Molekularbiologie

Agarose-Gelelektrophorese von DNA

TAE-Puffer	Probenpuffer orange (10fach)
40 mM Tris/Acetat, pH 8,0	0,4% Orange G
1 mM EDTA	30% Glycerol
	100 mM EDTA

Bakteriennährmedien

LB-Medium

10 g/l Trypton
10 g/l NaCl
5 g/l Hefeextrakt

LB-Amp-Plattenagar

100 µg Ampicillin/ml
Plattenagar

LB-Tetracyclin-Plattenagar

LB-Agar

15 g/l *Bacto*™ Agar in LB-
Medium

15 µg Tetracyclin/ml

Plattenagar

LB-Agar (Lennox)

35 g/l LB-Agar (Fertigpulver)

Transformation von *E. coli*

LB (1,5fach)

15 g/l Trypton
15 g/l NaCl
7,5 g/l Hefeextrakt
10 mM PIPES, pH 6,5

TSS-Lösung

15 ml LB (1,5fach)
4 ml PEG (MW 3350) 50%
0,4 ml 1 M MgCl₂
1 ml DMSO

CM-Lösung (10fach)

100 mM CaCl₂
100 mM MgCl₂

Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

TE-Puffer

10 mM Tris·HCl, pH 8,0
1 mM EDTA

Single stranded Carrier DNA

2 mg/ml in TE-Puffer

2. Material

Isolierung von Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

Lysepuffer

10 mM Tris·HCl, pH 8,0
100 mM NaCl
1 mM Na₂EDTA
2% Triton X-100
1% SDS

Sequenzierung von DNA

TBE-Puffer (10fach)

0,89 M Tris
0,89 M Borsäure
0,02 M Na₂EDTA
pH 8,3

cRNA-Synthese

MOPS-Puffer (10fach)

200 mM MOPS, pH 7,0
50 mM Na-Aacetat, pH 5,2
10 mM EDTA, pH 8,0

DEPC behandeltes Wasser

0,1% DEPC in Wasser

2.7.2 Proteinchemie

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Sammelgelpuffer (4fach)

0,5 M Tris·HCl, pH 6,8
0,4% SDS

Kathodenpuffer

25 mM Tris·HCl, pH 8,3
192 mM Glycin
0,1% SDS

Trenngelpuffer (4fach)

1,5 M Tris·HCl, pH 8,8
0,4% SDS

SDS-Probenpuffer (4fach)

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

SDS-Probenpuffer (2fach)

130 mM	Tris·HCl, pH 6,8
10%	SDS
2%	Lithiumdodecylsulfat
10%	β-Mercaptoethanol
20%	Glycerol
0,03%	Bromphenolblau

Rotiphorese® Blau R-Färbelösung

50% Rotiphorese® Blau R

Entfärbelösung

10% Essigsäure

30% Ethanol

Roti®-Blue-Färbelösung

20% Methanol

20% *Roti®-Blue* 5fach

Blotting

Transferpuffer (5fach)

25 mM	Tris·HCl, pH 8,3
192 mM	Glycin
0,0375%	SDS

Transferpuffer (1fach)

Verdünnung mit 20% Methanol

TBS-T

137 mM	NaCl
20 mM	Tris·HCl, pH 7,6
0,1%	Tween 20 in TBS

Ponceau S-Lösung

1%	Ponceau S
3%	Essigsäure

M-TBS-T

3% Milchpulver in TBS-T

2. Material

***Saccharomyces cerevisiae*-Nährmedien**

<i>YPD</i>		<i>YPD-Agar</i>	
20 g/l	Pepton	20 g/l	Oxoid Agar in YPD-Medium
10 g/l	Hefeextrakt		
20 g/l	D-Glucose		
<i>SD</i>		<i>SD-Agar</i>	
1,7 g/l	YNB	20 g/l	Oxoid Agar in SD-Medium
5 g/l	Ammoniumsulfat		
20 g/l	D-Glucose		
pH 5,6 mit NaOH		<i>Zusatz der für den jeweiligen Hefestamm essenziellen Aminosäuren zu den SD-Medien:</i>	
<i>SD Galactose</i>		20 mg/l	L-Histidin·HCl
1,7 g/l	YNB	20 mg/l	L-Lysin·HCl
5 g/l	Ammoniumsulfat	100 mg/l	L-Leucin
20 g/l	D-Galactose	20 mg/l	L-Tryptophan
pH 5,6 mit NaOH		20 mg/l	Adenosinsulfat

***Saccharomyces cerevisiae*-Wachstumsassays**

<i>Spurenelemente-Stammlösung</i> (1000fach)		<i>Vitamin-Stammlösung</i> (100fach)	
160 µM	H ₃ BO ₃	0,3 mM	Thiamin·HCl
4 µM	CuSO ₄	0,4 mM	Calcium-D-Panthenonat
13 µM	NaI	0,5 mM	Pyridoxin·HCl
16,5 µM	Na ₂ MoO ₄	0,6 µM	D-Biotin
49 µM	ZnSO ₄		
47,6 mM	Zitronensäure		
2,4 mM	MnSO ₄		
18,5 mM	FeCl ₃		

Präparation der mikrosomalen Fraktion aus *Saccharomyces cerevisiae*

Extraktionspuffer

25 mM Tris·HCl, pH 7,4

5 mM EDTA

Xenopus laevis Oozyten-Medien

ND96

96 mM NaCl

2 mM KCl

1,8 mM CaCl₂

1 mM MgCl₂

5 mM HEPES, pH 7,4

OR2

82,5 mM NaCl

2 mM KCl

1 mM MgCl₂

5 mM HEPES, pH 7,4

Totalmembranisolierung aus *Xenopus laevis* Oozyten

hypotoner Phosphatpuffer

7,5 mM Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄

pH 7,5

Plasmamembranisolierung aus *Xenopus laevis* Oozyten

HbA

5 mM MgCl₂

5 mM NaH₂PO₄

1 mM Na₂EDTA

80 mM Saccharose

20 mM Tris·HCl

pH 7,4

MBSS

80 mM NaCl

20 mM MES, pH 6,0

Zellkultur

DMEM·10% FCS

Dulbecco's modified Eagle's Medium mit:

10%	FCS
1%	Penicillin (10 000 U/ml)
1%	Streptomycin (10 mg/ml)

Einfriermedium

Dulbecco's modified Eagle's Medium mit:

10%	FCS
10%	DMSO

PBS

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
10 mM	Na ₂ HPO ₄
2 mM	KH ₂ PO ₄
	pH 7,4

Perfusionsversuche mit ratiometrischem pHluorin

Puffer für die pH-Perfusionsversuche mit Saccharomyces cerevisiae

Lösung 1

20 g/l	D-Glucose
10 mM	MOPS
	pH 6,8

Puffer für die pH-Perfusionsversuche mit Allium porrum-Epidermiszellen

0,1 mM	NaCl
0,1 mM	CaCl ₂
0,1 mM	MgCl ₂
2,5 mM	MES
	pH 6,2/5/4

Lösung 2

20 g/l	D-Glucose
	pH 3,0 mit HCl

Proteinreinigung an Ni²⁺-NTA

Alle Puffer wurden mit Proteaseinhibitor versetzt.

Bindungspuffer

100 mM	K ₂ HPO ₄
200 mM	NaCl
10%	Glycerol
5 mM	β-Mercaptoethanol
20 mM	Imidazol
3%	n-Octyl-β-D-glucopyranosid
	pH 8,0

Waschpuffer

100 mM	K ₂ HPO ₄
200 mM	NaCl
10%	Glycerol
5 mM	β-Mercaptoethanol
100 mM	Imidazol
2%	n-Octyl-β-D-glucopyranosid
	pH 7,0

Elutionspuffer

100 mM	K ₂ HPO ₄
200 mM	NaCl
10%	Glycerol
5 mM	β-Mercaptoethanol
1 M	Imidazol
2%	n-Octyl-β-D-glucopyranosid
	pH 7,0

Resuspensionspuffer

100 mM	K ₂ HPO ₄
	pH 8,0

2. Material

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Plasmidisolierung wurde eine *E. coli*-Kultur in LB-Medium mit Selektionsantibiotikum bei 37°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Für 5 ml Kulturen wurden *Wizard®* Mini-Präparationskits bzw. für 50-100 ml Kultursätze *NucleoBond®* Midi-Präparationskits nach Herstellerangaben verwendet.

3.1.2 Anlegen von Bakteriendauerkulturen

Für Dauerkulturen von *E. coli* wurde 2/3 Volumen Zellsuspension einer Übernachtungskultur mit 1/3 Volumen 80% Glycerol gemischt und bei -80°C gelagert.

3.1.3 Agarose-Flachbett-Gelelektrophorese

Gelelektrophorese von DNA

Die Agarosekonzentration wurde abhängig von den zu erwartenden Fragmentgrößen gewählt:

≥ 800 bp	1%
500-1000 bp	2%
≤ 500 bp	4%

Die Agarose wurde in TAE-Puffer suspendiert und in der Mikrowelle geschmolzen. Vor dem Ausgießen wurde 1 µl 1% Ethidiumbromidlösung pro 50 ml Ansatz zugefügt (0,2 µg/ml). Als Laupuffer diente TAE-Puffer. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen Ladepuffer versetzt und bei 80-100 V elektrophoretisch getrennt. EcoRI+HindIII bzw. PstI geschnittene λ-DNA diente als Größenmarker (s. Abb. 3.1). Es wurde unter UV-Licht bei 366 nm detektiert.

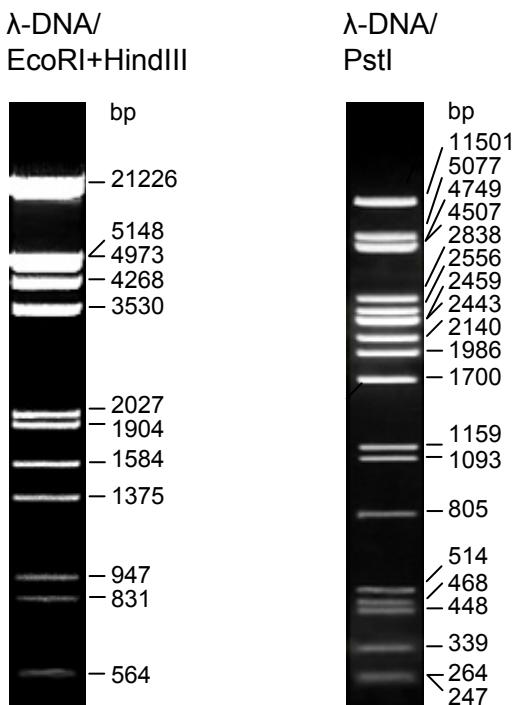


Abbildung 3.1: DNA-Größenmarker für die Agarose-Gelelektrophorese

Gelelektrophorese von RNA

Die elektrophoretische Auf trennung von RNA ermöglichte die qualitative Beurteilung der RNA hinsichtlich einer möglichen Degradation. Bei der Gelelektrophorese von RNA wurde 1,1% Formaldehyd als denaturierende Komponente zugesetzt. Dazu wurde 0,66% Agarose in DEPC behandeltem Wasser in der Mikrowelle geschmolzen. Nach dem Abkühlen auf etwa 55°C wurden die entsprechenden Mengen MOPS-Puffer (10fach) und Formaldehydlösung (37%) hinzugefügt.

5 µl RNA-Verdünnung (100 ng/µl) und 2 µl RNA-Größenmarker (200-6000 b) wurden mit Ethidiumbromid haltigem Ladepuffer im Verhältnis 1:1 versetzt. Die Proben wurden für 10 min bei 70°C denaturiert, kurz auf Eis gelagert und dann sofort auf das Gel aufgetragen. Bei einer konstanten Spannung von 80 V wurden die RNA-Moleküle aufgetrennt und das Trennungsmuster unter UV-Licht ausgewertet.

3.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Auf einem Agarosegel konnte die Nukleinsäuremenge über einen Intensitätsvergleich mit den Banden des Markers geschätzt werden.

Photometrisch wurde die Konzentration von Nukleinsäuren bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ bestimmt und wie folgt berechnet:

$$c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = E_{260 \text{ nm}} \cdot f \cdot \text{Verdünnung}$$

$f = 0,02$ bei RNA, Einzelstrang-DNA, Oligonukleotiden

$f = 0,04$ bei Doppelstrang-DNA, Plasmiden

Zusätzlich wurde durch Absorptionsmessung bei 230 nm auf Verunreinigung durch Kohlenhydrate und bei 280 nm auf Verunreinigung durch Proteine getestet.

Das Verhältnis $E_{260 \text{ nm}}/E_{230 \text{ nm}}$ liegt für reine DNA und RNA über 2. Für ausreichend reine DNA liegt das Verhältnis $E_{260 \text{ nm}}/E_{280 \text{ nm}}$ über 1,8 und für reine RNA über 2.

3.1.5 Restriktionsverdau von DNA

Beim Restriktionsverdau wurden 0,5-2 µg DNA in einem Volumen von 10-20 µl mit den Restriktionsenzymen (1 U/µg DNA) für mindestens 1 h inkubiert. Die Wahl von Puffer und Inkubationsbedingungen erfolgte nach Herstellerangaben. Bei Temperaturabweichungen und inkompatiblen Pufferbedingungen wurde in mehreren Schritten verdaut.

3.1.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Spezifische PCR-Primer wurden zum Einführen von Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen für Klonierungen und zur Amplifikation von ausgewählten DNA-Teilbereichen verwendet. Dabei wurde die zu amplifizierende Plasmid-DNA (20-40 ng) als *template* mit 5 µl 10fach PCR-Puffer (mit 15 mM MgCl₂), 10 pmol dNTP-Mix, je 20 pmol Oligonukleotiden und DNA-Polymerase (1 U *Pfu*- und 1 U *Taq*-bzw. 2 U *Pfu*-Polymerase) versetzt und mit Aqua bidest. auf 50 µl aufgefüllt. Die Reaktionszyklen DNA-Denaturierung, Oligonukleotid-Anlagerung und Neusynthese wurden in einem Thermocycler durchgeführt. Das Temperaturprogramm wurde jeweils auf die verwendeten Oligonukleotide und die Länge des DNA-Produktes abgestimmt (s. Tab. 3.1).

3. Methoden

Denaturierung	95°C	2 min
20-30 Zyklen:		
Denaturierung	95°C	30 s
Primer-Anlagerung	T _m	60 s
Extension	72°C	60-240 s
Extension	72°C	20 min
Lagerung	4°C	

Tabelle 3.1: PCR-Temperaturprogramm

Die Schmelztemperatur T_m in °C wurde für Primerlängen über 23 b mit folgender Formel näherungsweise berechnet und als Anlagerungstemperatur gewählt:

$$T_m = 60 + 0,41 (\% \text{ GC}) - 600/N$$

Dabei ist % GC der prozentuale GC-Gehalt und N die Anzahl der Basen im Primer. Unterschieden sich die errechneten T_m-Werte der Primer, so wurde mit der geringeren Temperatur gearbeitet.

Die Extensionszeit t_{ex} (in s) betrug mindestens 60 s und wurde wie folgt bestimmt:

$$t_{\text{ex}} = 0,06 \cdot \text{Länge des Produktes [bp].}$$

Das entstandene PCR-Produkt wurde anschließend über ein Agarosegel aufgereinigt.

3.1.7 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurde mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des *Nucleotrap®*-Kits nach Herstellerangaben. Um die Effizienz zu erhöhen, wurde später auf das *Hi Yield® PCR Clean-up & Gel-Extraction Kit* umgestellt. Es wurde mit 25 µl Aqua bidest. eluiert.

Bei sehr niedrigen Ausbeuten wurde mit der *SpeedVac®* aufkonzentriert.

3.1.8 Entsalzung von DNA

Mit den unter 3.1.7 beschriebenen Kits konnte auch die Entsalzung von DNA-Proben (bei Mehrfachverdau in unterschiedlichen Puffern oder vor der Ligation) durchgeführt werden. Die Hersteller liefern ein entsprechendes Protokoll. Die Elution erfolgte mit 25 µl Aqua bidest.

3.1.9 Glätten von überhängenden DNA-Enden (Klenow-Behandlung)

Um glatte (*blunt*) DNA-Enden zu erzeugen, wurde nach dem Restriktionsverdau das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* verwendet. Es wurden 1-2 µg DNA, Klenow-Puffer, dNTP-Mix (je 10 pmol) und Klenow-Fragment (1 U/µg DNA) zusammengegeben, der Ansatz 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend aufgereinigt.

3.1.10 5'-DNA-Dephosphorylierung

Eine Dephosphorylierung wurde durchgeführt, um die Religation eines Vektors mit kompatiblen Enden zu vermeiden. Dazu wurden 1-2 µg geschnittener Vektor mit 0,2 U alkalischer Phosphatase in Dephosphorylierungspuffer 45 min bei 37°C inkubiert.

3.1.11 Ligation von DNA

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten wurde ein Verhältnis von *insert* zu Vektor von 3:1 gewählt. Dabei wurden 50-100 ng Vektor pro Ligation eingesetzt. In einem Volumen von 10 µl wurde mit 1 µl T4 DNA-Ligase im entsprechenden Puffer mindestens eine Stunde oder über Nacht bei Raumtemperatur ligiert.

3.1.12 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger mit dem *Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing Kit*. 1-2 pmol Plasmid-DNA und 1-2 pmol fluoreszenzmarkierter Primer wurden mit Aqua bidest. auf 13 µl aufgefüllt. 1,5 µl Reaktionsmix wurde mit 3 µl der DNA/Primer-Lösung versetzt. Die Mischung wurde mit Mineralöl überschichtet, und die PCR (Programm s. Tab. 3.2) durchführt.

Denaturierung	95°C	2 min
30 Zyklen:		
Denaturierung	95°C	30 s
Primer-Anlagerung	55°C	30 s
Extension	72°C	60 s
Lagerung	4°C	

Tabelle 3.2: PCR-Programm für die Sequenzierung von DNA

Die Sequenzieransätze wurden mit 5 µl Formamid-Puffer versetzt und je 0,8-1 µl auf ein Polyacrylamidgel (6%) geladen (s. Tab. 3.3). Die Elektrophorese erfolgte mit Hilfe des Licor *DNA Sequencers* 4200 bei 1500 V mit TBE als Laufpuffer. Nach Laser-detection wurde mit der *BaselmagIR* V.4.2. Software ausgewertet.

30 ml	SequaGel XR 7,5%
7,5 ml	SequaGel Complete buffer reagent
400 µl	DMSO
300 µl	10% APS

Tabelle 3.3: Zusammensetzung des Sequenzergels

3.1.13 *In vitro* Mutagenese

Die Erzeugung von Punktmutationen erfolgte nach dem *QuickChange® Site-Directed Mutagenesis* Protokoll der Firma Stratagene. Als *template* diente Doppelstrang-Plasmid-DNA. Die Mutagenesepimer mit einer Länge von etwa 30 Basen enthielten die gewünschte Mutation ungefähr in der Mitte. Der GC-Gehalt sollte dabei über 40% betragen. Mit der in Abschnitt 3.1.6 angegebenen Formel konnte die Schmelztemperatur T_m geschätzt werden.

Die Synthese des Plasmids mit der gewünschten Mutation erfolgte mittels PCR unter Verwendung der *PfuTurbo®* DNA-Polymerase (s. Tab. 3.4 und 3.5). Nach Synthese der die Mutagenesepimer enthaltenden DNA-Plasmide wurde die Mutterstrang-DNA für mindestens 6 h mit DpnI verdaut, da dieses Restriktionsenzym methylierte DNA schneidet. Auf einem Agarosegel wurden Plasmidsynthese und Verdau kontrolliert. 10 µl des Reaktionsansatzes wurden für die Transformation von *E. coli* verwendet

(s. 3.1.15). Nach der Plasmidisolierung wurde das Vorhandensein der Mutation durch DNA-Sequenzierung überprüft (s. 3.1.12).

0,4 µl	Plasmid-DNA (200 ng/µl)
5 µl	<i>Pfu</i> Puffer 10x (20 mM MgSO ₄)
4 µl	dNTPs (je 2,5 mM)
1,5 µl	<i>sense</i> -Primer (25 µM)
1,5 µl	<i>antisense</i> -Primer (25 µM)
36,8 µl	Aqua bidest.
0,8 µl	<i>PfuTurbo</i> ® DNA-Polymerase

Tabelle 3.4: Pipettierschema für die *in vitro* Mutagenese

Denaturierung	95°C	30 s
12 Zyklen:		
Denaturierung	95°C	30 s
Primer-Anlagerung	T _m	1 min
Extension	68°C	1 min/kb Plasmidlänge
Extension	68°C	20 min
Lagerung	4°C	

Tabelle 3.5: PCR-Programm für die *in vitro* Mutagenese

3.1.14 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

CaCl₂-Methode (Cohen et al., 1972)

Der XL1-Blue-Stamm wurde auf einer LB-Agarplatte mit Tetracyclin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C gehalten. Am nächsten Tag wurde eine frische Bakterienkolonie in 5 ml LB-Medium mit Tetracyclin (15 µg/l) überführt und für etwa 10 h bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Diese Vorkultur wurde mit 100 ml LB-Medium mit Tetracyclin bei 20°C über Nacht geschüttelt. Die OD₆₀₀ sollte anschließend 0,5 betragen. Die Suspension wurde geteilt und 10 min auf Eis gekühlt. Nach Zentrifugation bei 4°C und 2000 x g für 10 min wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit je 15 ml kalter 0,1 M CaCl₂-Lösung versetzt und nach Inkubation auf Eis für 10 min vorsichtig resuspendiert. Danach wurde wieder für 10 min auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden

3. Methoden

erneut zentrifugiert und je Ansatz in 10 ml kalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und 20 min auf Eis gelagert. Nach Zentrifugation wurden die Zellpellets mit je 5 ml 20% Glycerol enthaltender 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert, vereinigt und 4 h auf Eis inkubiert. Es wurden 100 µl Aliquots bei -80°C gelagert.

Bei der Verwendung von DH5α-Zellen wurde kein Antibiotikum zugesetzt.

Da die PEG-DMSO-Methode bei gleicher Qualität der kompetenten Zellen schneller und einfacher durchzuführen ist, wurde im Verlauf umgestellt.

PEG-DMSO-Methode (Chung et al., 1989)

5 ml LB-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und bei 37°C und 180 rpm über Nacht inkubiert. 1 ml der Übernachtkultur wurde auf ein Volumen von 100 ml LB-Medium verdünnt (1:100) und weiter inkubiert (37°C, 200 rpm), bis eine OD₆₀₀ von 0,3-0,4 (frühe log-Phase) erreicht war. Die Zellen wurden dann mindestens 10 min auf Eis gehalten. Nach Pelletieren der Zellen bei 4°C und 2000 x g für 10 min wurde 10 ml kalte TSS-Lösung auf das Zellpellet gegeben und vorsichtig resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (4°C, 2000 x g, 10 min) wurden die Zellen in 10 ml TSS-Lösung aufgenommen und 10 min auf Eis gekühlt. 100 µl-Aliquots wurden bei -80°C eingefroren.

3.1.15 Standardtransformation von *E. coli*

CaCl₂-Methode

Der Ligationsansatz oder die zirkuläre Plasmid-DNA wurde mit 10 µl 10fach CM-Lösung versetzt und auf 100 µl mit Aqua bidest. aufgefüllt. Diese Lösung wurde vorsichtig zu 100 µl auf Eis angetauten, kompetenten Bakterienzellen pipettiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 s bei 42°C wurde der Ansatz 10 min auf Eis gekühlt. Es wurden 500 µl LB-Medium zu dem Ansatz pipettiert und 1 h bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden bei 2500 x g pelletiert und 500 µl des Überstandes verworfen. Mit dem Restvolumen wurde das Bakterienpellet vorsichtig resuspendiert, auf antibiotikahaltige Agarplatten gestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

PEG-DMSO-Methode

Bakterienzellen, die nach der PEG/DMSO-Methode kompetent gemacht wurden, konnten direkt mit dem Ligationsansatz versetzt werden. Die Arbeitsweise erfolgte dann entsprechend der CaCl₂-Methode.

3.1.16 Schnelltransformation von *E. coli*

50 ng Plasmid wurde zu 100 µl kompetenten *E. coli*-Zellen gegeben und die Mischung 10 min auf Eis gehalten. Der Transformationsansatz wurde auf Agarplatten mit Selektionsantibiotikum ausgestrichen und bei 37°C 12-16 h inkubiert.

3.1.17 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Plasmidisolierung aus Hefezellen wurde ein Hefetransformand in 2 ml SD-Selektionsmedium über Nacht bei 29°C und 180 rpm inkubiert. Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation für 10 s bei 16 000 x g gesammelt und in 200 µl Lyse-puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl *Roti*[®]-Phenol/C/I (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1) und 300 mg Glasperlen wurde 2 min gevortext. Nach Zentrifugation bei 16 000 x g für 5 min wurden 200 µl des Überstandes in ein neues Gefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 200 µl Isopropanol gefällt. Nach 10 min wurde für 5 min bei 16 000 x g zentrifugiert und das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Die Elution erfolgte mit 100 µl Aqua bidest., durch Erwärmen auf 50°C für 2 min wurde das restliche Ethanol verdampft. Da die gewonnene Plasmid-DNA sehr unrein war und die Hefe auch mehrere Plasmide gleichzeitig aufnehmen kann, wurde eine Transformation von *E. coli* im Anschluss durchgeführt (s. 3.1.15). Dafür wurde ein Volumen von 15 µl Plasmid-DNA eingesetzt.

3.1.18 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Transformation von Hefezellen wurde nach der Lithiumacetat-Methode durchgeführt (Ito *et al.*, 1983; Gietz *et al.*, 1995). Der zu transformierende Hefestamm wurde auf einer YPD-Agarplatte ausgestrichen und 3-5 Tage bei 29°C inkubiert. Eine einzelne Kolonie wurde in 5-10 ml YPD-Flüssigmedium überführt und über Nacht bei 29°C und 180 rpm geschüttelt. Die Hefesuspension wurde am Tag der Transformation auf eine OD₆₀₀ von 0,2 mit YPD-Flüssigmedium verdünnt. Ein 50 ml-Ansatz reichte für etwa 10 Transformationen. Es wurde weitere 3-5 h bei 29°C und 180 rpm inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht wurde. Die Hefezellen wurden für 5 min bei

3. Methoden

2500 x g gesammelt, mit 25 ml und anschließend mit 1 ml Aqua bidest. gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Aqua bidest. resuspendiert und jeweils 100 µl der Zellsuspension für jede Transformation vorgelegt. Nach Zentrifugation und Abtrennen des Überstandes wurde zu jedem Pellet 240 µl PEG 3500 50%-Lösung, 36 µl 1 M Lithiumacetatlösung, 50 µl *single stranded Carrier DNA*-Lösung (denaturierte Lachsperma-DNA, die 5 min im Wasserbad gekocht und dann auf Eis gekühlt wurde), 33 µl Aqua bidest. und 1 µl Plasmid-DNA gegeben. Der Transformationsansatz wurde zum Resuspendieren der Zellen gevortext und im Heizblock 45-60 min bei 42°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 13 000 x g für 20 s wurde der Überstand entfernt und die Hefezellen in 1 ml Aqua bidest. aufgenommen. Ein Volumen von 100 µl wurde auf eine Agarplatte mit SD-Selektionsmedium (SD-ura) ausplattiert. Selektiert wurde auf URA3 enthaltende Plasmide. Die Agarplatten wurden mit Parafilm abgedichtet und 3-5 d bei 29°C inkubiert.

3.2 Allgemeine proteinchemische Methoden

3.2.1 Bio-Rad-Proteinbestimmung

Das Bio-Rad Protein Assay-Reagenz wurde zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen gemäß Herstellerangaben verwendet. Dabei wurden 2-20 µl Proteinprobe mit Wasser auf 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl Bio-Rad Reagenz versetzt. Die Ansätze wurden gründlich gemischt und nach 5 min bei $\lambda = 595$ nm vermessen. Als Kalibrierstandard dienten verschiedene Konzentrationen BSA.

3.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese diente zur Auf trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Es wurde ein 5%iges Sammelgel und 10 oder 12,5%ige Trennägele verwendet. Die in Tabelle 3.6 angegebenen Mengen reichten für zwei Minigel. Die Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und mindestens 30 min bei 37°C im Heizblock inkubiert.

Als Molekulargewichtsmarker dienten der *peqGOLD prestained* Protein-Marker III und der *unstained peqGOLD* Protein-Marker I sowie der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus*.

Nach dem Auftragen der Proben (10-20 µl) und Beschickung der Apparatur mit SDS-Laufpuffer wurde die Elektrophorese zunächst zum Aufkonzentrieren der Proben bei

einer Spannung von 100 V gestartet und anschließend bei 180-200 V gehalten. Nach dem Austreten der Bromphenolblaubande aus dem Gel wurde die Elektrophorese beendet, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel gefärbt oder für den Elektroblot verwendet.

Gefärbt wurden die Gele mit Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung (Rotiphorese® Blau R) für 1 h, Entfärbelösung wurde über Nacht angewendet. Wegen der höheren Empfindlichkeit wurde später auf kolloidale Färbelösung (*Roti®-Blue*) umgestellt. Hier wurden die Gele nach Inkubation über Nacht wegen der spezifischen Anfärbung nur mit Wasser abgespült.

	Trenngel 10%	Trenngel 12,5%	Sammelgel 5%
H ₂ O	5 ml	4 ml	2,4 ml
Trenngelpuffer	3 ml	3 ml	
Sammelgelpuffer			1 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	4 ml	5 ml	0,6 ml
10% APS	20 µl	20 µl	12 µl
TEMED	10 µl	10 µl	6 µl

Tabelle 3.6: Zusammensetzung von 10 und 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgelen

3.2.3 Blotting

Elektroblot

Die Proteine wurden zum immunochemischen Nachweis durch *semidry* Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran übertragen. Pro Gel wurden sechs auf Gelgröße zugeschnittene Whatmanpapiere in Transferpuffer äquilibriert. Eine zugeschnittene PVDF-Membran wurde zunächst in Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer äquilibriert. Zwischen den beiden Elektroden einer *semidry* Blotapparatur wurde der Blot wie folgt aufgebaut: Auf die Anodenplatte wurden drei getränktes Whatmanpapiere, die PVDF-Membran, darauf das Gel und noch einmal drei getränktes Whatmanpapiere luftblasenfrei aufgeschichtet. Der Proteintransfer erfolgte bei einer Stromdichte von etwa 1 mA/cm² und einer maximalen Spannung von 20 V über einen Zeitraum von 60-90 min.

Western Blot

Nach elektrophoretischer Auftrennung (s. 3.2.2) und dem Elektrotransfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (s.o.) wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation der Membran in 3% M-TBS-T für mindestens 1 h blockiert. Nach Waschen mit TBS-T wurde die Membran mit der Primärantikörper-Lösung (1:200 bis 1:1000 in M-TBS-T) für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Zur Entfernung von ungebundenem Antikörper wurde die Membran 2 x kurz und 3 x 10 min mit TBS-T gewaschen. Der HRP-konjugierte Zweitantikörper (1:2000 bis 1:5000 in M-TBS-T) verblieb 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln auf der Membran. Es wurden die gleichen Waschschritte wie zuvor durchgeführt (Zhang *et al.*, 2007).

Die Peroxidase-katalysierte Chemilumineszenzreaktion mit dem *ECL Plus Western Blotting Detection System* erfolgte nach Herstellerangaben. Die Lumineszenz wurde durch Belichtung (5 s bis 15 min) von *Hyperfilm-ECL* detektiert.

Zum Anfärben der Proteine auf der Membran wurde diese mit Wasser abgespült, kurz in Ponceau S-Lösung gehalten und mit Wasser entfärbt, bis die Proteinbanden sichtbar wurden.

3.3 Proteinexpression in *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae-Wachstumsassays

1,5 ml Selektions-Flüssigmedium (SD-ura) wurde mit einer transformierten Hefekolonie beimpft und über Nacht bei 29°C und 180 rpm geschüttelt. Am Versuchstag wurde diese Hefesuspension bei 16 000 x g zentrifugiert und das Hefepellet zweimal mit je 1 ml Aqua bidest. gewaschen. Das Pellet wurde in Aqua bidest. resuspendiert und eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt. Ausgehend von dieser Verdünnung wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe hergestellt (OD₆₀₀ = 10⁻¹/10⁻²/10⁻³).

Jeweils 5 µl der Suspensionen wurden in der Reihenfolge OD₆₀₀ = 1/10⁻¹/10⁻²/10⁻³ auf die für den jeweiligen Test vorbereiteten Agarplatten pipettiert. Nach Verdunsten des Wassers wurden die Platten bei 29°C für 3-6 d inkubiert und gescannt.

Abweichend von dieser Vorschrift wurde das Zellpellet beim Kaliumaufnahmearassay fünfmal gewaschen, da das Hefemedium mit 50 mM KCl supplementiert wurde und die Hefezellen von anhaftenden Kaliumionen befreit werden mussten.

3.3.1 Methylamin-Efflux-Assay

Prinzip

Der Methylamin-Efflux-Assay ist ein Hefewachstumstest zur Untersuchung der Methylaminleitfähigkeit von exprimierten Aquaporinen (Wu *et al.*, 2008). Methylamin ist ein chemisches Analogon von Ammoniak und besitzt eine hohe Toxizität für Hefezellen, da es von diesen nicht metabolisiert werden kann und proliferationshemmend wirkt. Dem verwendeten Hefestamm BY4742Δfps1 fehlt das endogene Aquaglyceroporin Fps1, welches neben Glycerol auch Ammoniak leitet, so dass die Zelle das giftige Methylamin nicht ausschleusen kann (Luyten *et al.*, 1995).

Das Medium wurde mit 0,1% Prolin als Stickstoffquelle und 50 mM Methylammoniumchlorid supplementiert. Bei physiologischem pH-Wert dominiert geladenes Methylammonium ($pK_s = 10,64$). Die Konzentration an ungeladenem Methylamin beträgt 0,36 µM bei pH 5,5 und 3,6 µM bei pH 6,5 sowie 36 µM bei pH 7,5.

Geladenes Methylammonium wird über die physiologischen Ammoniumtransporter Mep1-3 (Marini *et al.*, 1994) unidirektional in die Hefezellen aufgenommen und akkumuliert intrazellulär. Bei heterologer Expression von Methylamin leitenden Aquaporinen können die Hefezellen durch Methylaminefflux überleben (s. Abb. 3.2). Der vom Zytosol (pH 7,2) nach außen gerichtete Methylamingradient ist dabei umso größer, je saurer das Medium ist.

Als Positivkontrolle diente der Wildstamm BY4742, der die Entgiftung über Fps1 ermöglicht.

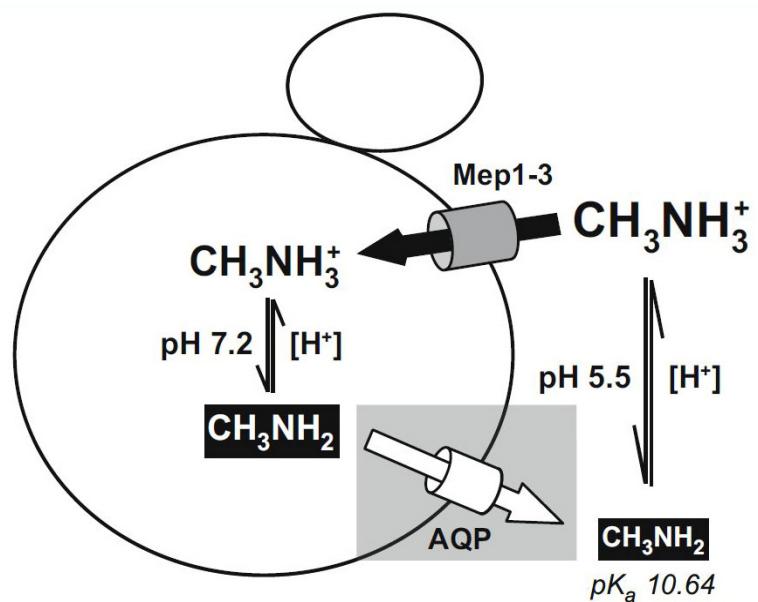


Abbildung 3.2: Schema des pH-abhängigen Transports von Methylamin/Methylammonium in Hefezellen ohne *Fps1*. Ohne Methylamin leitende Aquaporine akkumuliert das über *Mep1-3* aufgenommene geladene Methylammonium intrazellulär. Heterolog exprimierte Aquaporine können die Hefezelle durch Efflux von Methylamin entgiften.

Vorschrift

Die Vorschrift ist für vier Agarplatten bestimmt (Gesamtvolumen 120 ml).

Lösung 1:

	pH 5,5	pH 6,5	pH 7,5
Pufferlösung	2,4 ml 1 M MES	2,4 ml 1 M MES	2,4 ml 1 M MOPS
Aqua bidest.	62 ml	62 ml	62 ml

Nach Einstellen des pH-Wertes mit NaOH wurde pro Ansatz 2,5 g Oxoid Agar hinzugefügt und autoklaviert.

Lösung 2:

	pH 5,5 / 6,5 / 7,5
0,85% YNB	24 ml
15% D-Glucose	24 ml
1 M Methylamin	6 ml
5% L-Prolin	2,4 ml
2% L-Leucin	0,6 ml
2% L-Lysin·HCl	0,2 ml
2% L-Histidin·HCl	0,2 ml

Die sterilfiltrierten oder autoklavierten Stammlösungen wurden steril abgefüllt. Die Lösung 2 wurde bei 50°C im Wasserbad gehalten. Es wurden Lösung 1 und 2 bei etwa 50°C gemischt und pro Petrischale 30 ml ausgegossen.

3.3.2 Ammoniak-/Ammoniumaufnahmeassay

Prinzip

Die Hefezelle ist auf die Aufnahme von Ammoniak als Stickstoffquelle für die Zellproliferation angewiesen. Als Testsystem für die Untersuchung der Ammoniakleitfähigkeit diente der Hefestamm 31019Δfps1. Bei diesem sind sowohl das endogene Aquaglyceroporin Fps1, welches neben Glycerol auch Ammoniak leitet, als auch die drei endogenen Ammoniumtransporter Mep1-3 deletiert. Die Hefezellen zeigen ein stärkeres Wachstum, wenn ein alternativer Weg der Ammoniakaufnahme durch ein heterolog exprimierte Aquaporin besteht.

Das Medium enthielt als einzige Stickstoffquelle eine sehr geringe Konzentration an Ammoniak/Ammonium (1-4 mM). Die Ammoniakkonzentration ($pK_s = 9,25$) wurde durch Einstellen unterschiedlicher pH-Werte variiert. Bei einer Gesamtkonzentration von 4 mM im Medium resultierte eine Ammoniakkonzentration von 0,071 μM bei pH 4,5 und 0,71 μM bei pH 5,5, 7,1 μM bei pH 6,5 sowie 71 μM bei pH 7,5, während die Ammoniumkonzentration kaum beeinflusst wurde.

Als Positivkontrolle diente ein Ammoniumtransporter aus der Tomate (LeAMT1;1) mit pH-unabhängiger Ammoniumaufnahme (Khademi *et al.*, 2004). Hefezellen, die mit dem leeren Vektor transformiert wurden, dienten als Negativkontrolle und zeigten das Hintergrundwachstum auf der Basis transmembranärer Ammoniakdiffusion an.

Vorschrift

Für den Ammoniumaufnahmeassay wurden Agarplatten mit 1/2/4 mM Ammonium bei verschiedenen pH-Werten (4,5/5,5/6,5/7,5) verwendet. Die folgende Vorschrift reichte für vier Platten (120 ml Gesamtvolumen).

Lösung 1:

	pH 4,5	pH 5,5	pH 6,5	pH 7,5
Pufferlösung	9,6 ml 0,5 M Succinat	9,6 ml 0,5 M Succinat	4,8 ml 1 M MES	4,8 ml 1 M MOPS
1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	60/120/240 μl	60/120/240 μl	60/120/240 μl	60/120/240 μl
Aqua bidest.	ad 72 ml	ad 72 ml	ad 72 ml	ad 72 ml

Der pH-Wert wurde mit 5 N NaOH eingestellt, 2,5 g Oxoid Agar pro Ansatz hinzugegeben und autoklaviert.

Lösung 2:

	pH 4,5 / 5,5 / 6,5 / 7,5
0,85% YNB	24 ml
15% D-Glucose	24 ml

Lösung 2 wurde steril abgefüllt und bei 50°C im Wasserbad gehalten.

Zum Ausgießen wurden beide Lösungen bei einer Temperatur von etwa 50°C gemischt, und es wurden jeweils 30 ml pro Petrischale ausgegossen.

Gradientenplatte

Die Gradientenplatte bestand aus einer angeschrägten Schicht Medium mit 4 mM Ammonium, allerdings wurde im Unterschied zu der oben angegebenen Vorschrift 30 mM HEPES als Puffersubstanz eingesetzt und der pH auf 8 gebracht. Nach dem Aushärten wurde überschichtet mit der gleichen Menge Medium, welches mit Weinsäure auf pH 4 eingestellt wurde und ebenfalls 4 mM Ammonium enthielt (Maresova und Sychrova, 2005). Beide Schichten enthielten 0,01% Bromthymolblau als pH-Indikator.

Die Übernachtkulturen der Transformanden wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,05 eingestellt und jeweils 10 μl Tropfen reihenweise auf die Gradientenplatte platziert.

3.3.3 Kaliumaufnahmeassay

Prinzip

Der Kaliumaufnahmeassay wurde in Arginin-Phosphat-Medium, einem Minimalmedium mit niedrigem Salzgehalt, durchgeführt (Rodriguez-Navarro und Ramos, 1984). Es wurde der Hefestamm CY162 verwendet, bei dem die beiden endogenen Kaliumtransporter Trk1 und Trk2 deletiert sind (Anderson *et al.*, 1992). Diese sind normalerweise für die Akkumulation von Kaliumionen in Hefezellen verantwortlich (van der Rest *et al.*, 1995). Da Kaliumionen auch in *Saccharomyces cerevisiae* den größten Anteil an Kationen stellen und an zahlreichen enzymatischen Aktivitäten beteiligt sind, können CY162-Hefezellen bei einer Kaliumkonzentration von weniger als 0,5 mM nur überleben, wenn Kaliumionen über heterolog exprimierte Kanäle aufgenommen werden. Bei höheren Konzentrationen gelangen Kaliumionen auch über unspezifische Ionenkanäle wie NSC1 in die Zellen (Bihler *et al.*, 2002). Getestet wurde bei verschiedenen Kaliumkonzentrationen (0,1/0,5/1/2 mM). Der Kaliumkanal AtKAT1 aus *Arabidopsis thaliana* diente als Positivkontrolle (Anderson *et al.*, 1992).

Vorschrift AP-Medium

Arginin-Phosphat-Medium (AP-Medium) für 120 ml (vier Platten):

Lösung 1:

Arginin (freie Base)	0,252 g
1M MgSO ₄	0,12 ml
1M CaCl ₂	12 µl
Aqua bidest.	102,5 ml

Der pH-Wert der Lösung 1 wurde mit Phosphorsäure auf 5,5 eingestellt und anschließend 5 g Agarose hinzugegeben. Die Lösung 1 wurde autoklaviert.

Lösung 2:

15% D-Glucose	16 ml
Spurenelemente-Stammlösung	0,12 ml
Vitamin-Stammlösung	1,2 ml

Die Ausgangslösungen wurden steril abgefüllt und Lösung 2 bei 50°C im Wasserbad gehalten. Nach dem Autoklavieren von Lösung 1 wurden beide Lösungen bei 50°C ausgegossen. Pro Petrischale wurden 30 ml des Gemisches verwendet.

3. Methoden

Für den Kaliumaufnahmestress assay wurde Lösung 2 mit jeweils 6/30/60/120 µl 2 M KCl-Lösung supplementiert (0,1/0,5/1/2 mM KCl) und jeweils 120 µl 2% L-Histidinlösung (0,002% L-Histidin) zugesetzt.

3.3.4 Natriumstresstest

Prinzip

Hohe intrazelluläre Natriumkonzentrationen sind toxisch für die meisten Organismen, so auch für die Hefe (Maresova und Sychrova, 2005). Beim Natriumstresstest wurden Hefezellen des MA5-Stammes (Benito et al., 2004) verschiedenen Natriumkonzentrationen ausgesetzt. Dem natriumsensitiven Hefestamm MA5 fehlen endogene Natriumionen-Efflux-Systeme wie die Na⁺-ATPasen Ena1-4 und der Na⁺- und K⁺/H⁺-Antiporter. Verglichen wurde das Wachstum von MA5-Zellen, die Aquaporine heterolog exprimierten, mit Zellen, die mit leerem Vektor transformiert worden waren. Ein reduziertes Wachstum im Vergleich zur Negativkontrolle war auf zusätzlichen Einstrom von Natriumionen durch den Kanal zurückzuführen.

Vorschrift

Der Natriumstresstest erfolgte in AP-Medium (s. 3.3.3). Anstelle von 5 g Agarose wurde 2,5 g Oxoid Agar zugesetzt.

Für den MA5-Stamm war ein Gehalt von 0,002% L-Tryptophan, 0,002% Adenosinsulfat sowie 50 mM KCl essenziell (Zugabe von 240 µl 1% L-Tryptophanlösung, 480 µl 0,5% Adenosinsulfatlösung und 3 ml 2 M KCl-Lösung).

Außerdem wurden NaCl-Konzentrationen von 50/100/200 mM eingestellt (Zugabe von 3/6/12 ml 2 M NaCl-Lösung). Platten ohne NaCl-Zusatz dienten als Kontrolle. Das in der Vorschrift angegebene Wasservolumen wurde entsprechend der zugesetzten Volumina korrigiert.

3.3.5 pH-Stresstest

Prinzip

Der pH-Stresstest wurde mit dem Hefestamm CY162 auf Agarplatten mit AP-Minimalmedium durchgeführt. Analysiert wurde das Wachstum bei verschiedenen pH-Werten. Es wurden CY162-Hefezellen, die mit Leerplasmid transformiert worden waren (Negativkontrolle), verglichen mit Aquaporin exprimierenden CY162-Hefezellen. Bei Expression von Protonen leitenden Kanälen war vermindertes Wachstum

der Hefezellen zu erwarten, da mehr Protonen aktiv aus der Zelle gepumpt werden mussten.

Vorschrift

Das AP-Medium wurde wie unter 3.3.3 beschrieben hergestellt. Abweichend von dieser Vorschrift wurde eine definierte Menge Aqua bidest. (50 ml) mit 2,5 g Oxoid Agar autoklaviert. Der Rest der Bestandteile des AP-Mediums wurde zusammengegeben und die Wassermenge entsprechend reduziert. Lösung 1 wurde wegen der Deletion der endogenen Kaliumkanäle des CY162-Stammes mit KCl und zusätzlich mit L-Histidin supplementiert (50 mM KCl und 0,002% L-Histidin).

Der pH-Wert wurde mit ortho-Phosphorsäure auf jeweils pH 3, 4, 5 oder 6 eingestellt. Die gesamte Lösung wurde sterilfiltriert und auf 50°C gehalten, dann mit der heißen autoklavierten Agar/Wasser-Lösung gemischt und ausgegossen.

3.3.6 Wachstumskurvenanalyse mit dem *Bioscreen*

Für die genauere Untersuchung des Natrium- und pH-Stresses der Mutanten wurden Wachstumskurven mit dem *Bioscreen* aufgenommen. Dieses Gerät zeichnet automatisch in definierten Intervallen die optische Dichte der Kulturen in einer Mikrotiterplatte auf. Aus den gesammelten Absorptionswerten lassen sich Wachstumskurven erstellen. Dazu wurden Transformanden aus Übernachtkulturen in Selektivmedium zweimal mit Aqua bidest. gewaschen und anschließend auf eine OD₆₀₀ von 10 eingestellt. 3,5 µl der Zellsuspension wurden in 100-Loch Mikrotiterplatten in ein Volumen von 350 µl des Testmediums pipettiert, so dass eine Start-OD₆₀₀ von 0,1 resultierte. Die Geräteparameter wurden auf Messung der optischen Dichte mit einem Breitbandfilter (420-580 nm) in 30 min-Intervallen nach Schütteln der Mikrotiterplatten für 10 s (Stufe medium) festgesetzt. Die Wachstumskurven wurden über 120 h verfolgt.

Die verwendeten Medien wurden nach den jeweiligen Vorschriften für den Natriumstresstest (s. 3.3.4) und den pH-Stresstest (s. 3.3.5) vorbereitet. Dabei wurden Flüssigmedien mit allen Zutaten ohne Agar hergestellt und nach der pH-Einstellung sterilfiltriert.

3.3.7 Präparation der mikrosomalen Fraktion aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die transformierten Hefezellen wurden in 100 ml SD-Medium überführt und 1-2 d bei 29°C und 180 rpm inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 1 erreicht war. Die Zellen wurden durch Zentrifugation 5 min lang bei 4°C und 2500 x g gesammelt, mit 10 ml kaltem demineralisierten Wasser und anschließend mit 5 ml kaltem Extraktionspuffer gewaschen. Die Hefezellen wurden in 500 µl kaltem, mit Proteaseinhibitor versetztem Extraktionspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 0,5 g mit Säure gewaschenen Glasperlen wurden die Zellen durch Vortexen über 10 x 30 s aufgeschlossen und zwischen jedem Intervall 1 min auf Eis gelagert. Der Überstand wurde 5 min bei 1000 x g und 4°C zum Abtrennen der Zelltrümmer zentrifugiert. Anschließend wurde durch Zentrifugieren des Überstandes bei 100 000 x g die Membranfraktion pelletiert. Diese wurde in 200 µl PBS-Puffer solubilisiert. Nach Bestimmung der Protein-Konzentration (s. 3.2.1) wurde eine definierte Menge mit Ladepuffer versetzt, 30 min bei 37°C denaturiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

3.4 Proteinexpression in *Xenopus laevis* Oozyten

3.4.1 Oozyten-Präparation

Ein *Xenopus laevis* Froschweibchen wurde durch Bad in 0,24% Tricainlösung anästhetisiert und auf Eis operiert. Durch einen etwa 1 cm langen Schnitt auf der Bauchseite wurden die Haut und anschließend die Bauchdecke mit einer Schere durchtrennt. Teile des Ovarialsackes wurden entnommen. Bauchdecke und Haut wurden mit resorbierbarem Nahtmaterial wieder verschlossen.

Zur Entfernung des Bindegewebes und der Follikelzellen, die die Oozyten umgeben, wurden Ovarlappen mit der Pinzette vorsichtig zerkleinert, mehrfach mit Ca²⁺-freier OR2-Lösung gewaschen und anschließend bei 37°C unter Schütteln (180 rpm) mit Collagenase A-Lösung (0,5 mg/ml in OR2-Lösung) für 20-50 min inkubiert. Die defollikulierten Oozyten wurden mindestens fünfmal mit ND96-Puffer gewaschen, um die Collagenase und abgebautes Follikularepithel zu entfernen. Oozyten der Reifeklassen V und VI wurden unter einer Stereolupe ausgelesen und bis zur Injektion bei 4°C in ND96-Puffer gelagert.

3.4.2 cRNA-Synthese

Bei den Arbeiten mit cRNA wurden alle verwendeten Kunststoffmaterialien mit DEPC-Wasser behandelt und autoklaviert. Die *in vitro* Synthese von cRNA wurde mit der T7 RNA Polymerase unter Verwendung des *mMESSAGE mMACHINE*[®]-Kits nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Es wurden 4 µg NotI linearisiertes pOG1-Plasmid eingesetzt. Das linearisierte Plasmid wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetatlösung und 2,5fachem Volumen Ethanol präzipitiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Die cRNA-Synthese erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz für 2 h bei 37°C. Nach Verdau der DNA für 15 min bei 37°C wurde die cRNA durch Zugabe von 30 µl LiCl-Präzipitationslösung über Nacht bei -20°C präzipitiert. Das mit 70% Ethanol gewaschene, getrocknete Pellet wurde in 25 µl DEPC-Wasser gelöst. Die Konzentration der cRNA wurde photometrisch ermittelt und mit DEPC-Wasser auf eine Konzentration von 100 ng/µl eingestellt. Größe und Reinheit der cRNA wurden auf einem denaturierenden Agarosegel kontrolliert (s. 3.1.3). Aliquots der verdünnten cRNA wurden bei -80°C gelagert.

3.4.3 Oozyten-Injektion

Die Injektion der cRNA erfolgte am Tag der Oozyten-Präparation, spätestens jedoch nach 24 h. Es wurden zunächst Injektionspipetten aus Glaskapillaren mit einem automatischen Pipettenziehgerät angefertigt. Die Oozyten-Injektion wurde unter der Stereolupe mit einem Nanoliter-Injektor durchgeführt. Es wurden 50 nl cRNA-Lösung (100 ng/µl) oder 50 nl ND96-Puffer als Negativkontrolle eingesetzt. Bei Koinjektionen wurden die cRNA-Lösungen (100 ng/µl) im Verhältnis 1:1 gemischt. Injiziert wurde in den braun pigmentierten animalen Pol der Oozyte. Nach der Injektion wurden die Oozyten in ND96-Puffer für 3 d bei 16°C inkubiert.

3.4.4 Standard-Oozyten-Schwelltest

Vor der Messung wurden die Oozyten mindestens 5 min in frischem ND96-Puffer äquilibriert. Zur Bestimmung der Wasserpermeabilität wurde eine Oozyte in 1:3 verdünnten ND96-Puffer gegeben. Für die Messung der Solutleitfähigkeit wurden 65 mM NaCl durch 130 mM Testsolut (Harnstoff bzw. Glycerol) ausgetauscht. Die Lösungen wurden mit einem Osmometer auf Isoosmolalität (+/- 5 mosm/kg) in Bezug auf den ND96-Puffer überprüft.

3. Methoden

Für die Schwelltests bei unterschiedlichen pH-Werten wurden im ND96-Puffer jeweils 5 mM HEPES durch 5 mM MES (pH 5 und 6) bzw. durch 5 mM Succinat (pH 4) ersetzt. Die ND96-Lösungen pH 2 und 3 wurden ohne Pufferzusatz mit HCl angefertigt. Die Osmolalität aller Puffer und deren 1:3-Verdünnungen wurde bestimmt (Abweichungen < 5 mosm/kg). Bei den Messungen in unterschiedlichen pH-Werten wurden die Oozyten vorher kurz in ND96-Puffer mit dem untersuchten pH-Wert getaucht, um die pH-Änderung der 1:3 verdünnten Testlösung zu minimieren.

Die Schwelltests wurden bei Raumtemperatur unter dem Mikroskop durchgeführt. Die Auswertung erfolgte computergestützt über eine Videokamera (Objektiv 2,5x). Das relative Volumen (V/V_0) konnte aus der Fläche, die durch die Oozyte bedeckt wird, bestimmt werden.

Die osmotische Wasserpermeabilität (P_f -Wert in $\mu\text{m s}^{-1}$) wurde wie folgt berechnet:

$$P_f = \frac{V_0 \cdot \frac{d(V/V_0)}{dt}}{S_0 \cdot V_w \cdot (osm_{in} - osm_{out})}$$

Bestimmt wurde der P_f -Wert demnach aus dem Oozytenanfangsvolumen ($V_0 = 9 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3$), aus der relativen Volumenzunahme im linearen Bereich $d(V/V_0)/dt$, der mittleren Oozytenoberfläche ($S_0 = 0,045 \text{ cm}^2$), dem molekularen Wasservolumen ($V_w = 18 \text{ cm}^3/\text{mol}$) und dem osmotischen Gradienten ($osm_{in} - osm_{out}$) zwischen dem Oozyteninneren und der externen Lösung (140 mosM).

Die isoosmotische Solutpermeabilität (P_s -Wert in $\mu\text{m s}^{-1}$) wurde nach folgender Gleichung bestimmt:

$$P_s = \frac{osm_{total} \cdot V_0 \cdot \frac{d(V/V_0)}{dt}}{S_0 \cdot (sol_{out} - sol_{in})}$$

Die totale Osmolarität des Systems osm_{total} betrug 210 mosM, der isoosmotische Solutgradient ($sol_{out} - sol_{in}$) 130 mM.

3.4.5 Expressionskontrolle in *Xenopus laevis* Oozyten

Totalmembranisolierung aus *Xenopus laevis* Oozyten

Nach Injektion der cRNA und Inkubation für 3 d bei 16°C wurden 5-10 Oozyten mit kaltem hypotonen Phosphatpuffer auf Eis durch Auf- und Abpipettieren lysiert. Pro Oozyte wurden 100 µl Puffer eingesetzt. Zum Abtrennen der Zellbestandteile wurde 5 min bei 4°C und 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und 30 min bei 16 000 x g und 4°C zentrifugiert. Die oben schwimmende Dotterschicht wurde vorsichtig mit einem Papiertuch abgenommen und der Überstand verworfen. Das Pellet mit den Membranproteinen wurde in einfach konzentriertem SDS-Probenpuffer resuspendiert und mindestens 30 min bei 37°C solubilisiert. Pro SDS-PAGE-Spur wurde die einer Oozyte entsprechende Proteinmenge aufgetragen.

Plasmamembranisolierung von *Xenopus laevis* Oozyten

Die Plasmamembranisolierung erfolgte durch Polymerisierung mit der Vitellinmembran und mehrstufige Zentrifugation bei geringer Beschleunigung (Leduc-Nadeau *et al.*, 2007). Die mit cRNA injizierten Oozyten wurden 3 d bei 16°C inkubiert. Nach Waschen der Oozyten mit MES-gepufferter Salzlösung (MBSS) wurden jeweils 25 Oozyten in Petrischalen (35 mm Durchmesser) in einer frisch hergestellten 0,003% Subtilisin A-MBSS-Lösung 10 min bei Raumtemperatur vorsichtig bewegt. Die Oozyten wurden mit kalter 1%iger Ludox-MBSS-Lösung versetzt und 1 h bei 4°C unter leichter Bewegung gehalten. Anschließend wurden die Oozyten 1 h in mit 0,1% Polyacrylsäure versetzter MBSS bei 4°C leicht geschüttelt. Nach jedem Schritt wurden die Oozyten mit MBSS gewaschen. Jeweils 25 intakte Oozyten wurden in 500 µl kalter mit Proteaseinhibitor versetzter HbA-Lösung durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Nach Zugabe von 1 ml HbA-Lösung wurde bei 14 x g 30 s bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde sehr vorsichtig abpipettiert, so dass ein Restvolumen von 100 µl verblieb, welches die Plasmamembranen als Blättchen enthielt. Es schlossen sich weitere Zentrifugationsschritte mit dem gleichen Vorgehen bei 22 x g, 31 x g und 42 x g an. Anschließend wurden die gereinigten Plasmamembranen 10 min bei 16 000 x g und 4°C gesammelt. Das Pellet wurde mit 10-15 µl HbA resuspendiert und 30 min bei 37°C mit SDS-Probenpuffer inkubiert. Eine aus 25 Oozyten isolierte Menge an Plasmamembranproteinen wurde pro Spur auf ein SDS-Gel aufgetragen.

3.5 Zellkultur von HEK-293-Zellen

Die Zelllinie HEK-293 wurde aus einer humanen, embryonalen Nieren-Primärkultur gewonnen und mit Adenovirus Typ 5 transformiert (Graham *et al.*, 1977). Die Kultivierung der HEK-293-Zellen erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und Feuchtigkeitssättigung im CO₂-Inkubator. Sie wurden in Zellkulturflaschen mit TC-Beschichtung (25 cm² oder 75 cm²) in DMEM mit 10% FCS gehalten. Die Arbeit mit den HEK-293-Zellen erfolgte an der Sterilbank. Alle verwendeten Lösungen und Materialien waren steril. Das Kulturmedium und der PBS-Puffer wurden vor der Verwendung auf 37°C erwärmt.

3.5.1 Passagieren der HEK-293-Zellen

Die HEK-293-Zellen wuchsen adhärent. Sie wurden bei Konfluenz mit sterilem PBS-Puffer gewaschen und mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst. Für eine Kulturflasche (25 cm²) wurde 0,25 ml Trypsin-EDTA-Lösung eingesetzt und 3 min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden sofort in 5 ml Kulturmedium resuspendiert, um den Trypsinisierungsvorgang zu stoppen. In einer Verdünnung von 1:4 bis 1:8 wurden die Zellen wieder in neue Kulturgefäße ausgesät. Die Verdopplungszeit betrug 24-36 h.

3.5.2 Anlegen und Auftauen von Dauerkulturen

Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung)

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden konfluente Zellmonolayer einer Zellkulturflasche (25 cm²) nach dem Waschen mit PBS-Puffer und Trypsinisierung in 2,6 ml Einfriermedium resuspendiert und auf zwei Kryoröhrchen aufgeteilt. Nach Zugabe des Einfriermediums musste schnell gearbeitet werden, um eine Schädigung der Zellen durch das enthaltene DMSO zu vermeiden. Die Kulturen wurden in Einfrierboxen, die eine schnelle, definierte Abkühlung gewährleisten, bei -80°C eingefroren und zur Dauerlagerung nach 24 h in Flüssigstickstoff überführt.

Auftauen von Dauerkulturen

Für jedes Kryoröhrchen wurden drei 25 cm² Kulturflaschen mit je 5 ml vorgewärmtem Kulturmedium bzw. eine 75 cm² Kulturflasche mit 15 ml Medium vorbereitet. Die Kryokultur wurde bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, dann sofort in die Flaschen überführt und für mindestens 2 d inkubiert.

3.5.3 Bestimmung der Zellzahl

Ein Aliquot der zu zählenden Zellsuspension wurde 1:4 mit 0,4% Trypanblaulösung gemischt und nach 3 min Inkubation bei 37°C in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Lebende Zellen mit intakter Membran werden im Gegensatz zu absterbenden oder toten Zellen nicht blau angefärbt. Die Zellkonzentration ergibt sich aus dem Mittelwert der Zellzahl aus vier Großquadranten unter Berücksichtigung des Kammerfaktors und des Verdünnungsfaktors mit Trypanblaulösung.

3.5.4 Beschichtung mit Poly-L-Lysin

Glasdeckgläschen mussten zur besseren Haftung der Zellen mit Poly-L-Lysin beschichtet werden: Je 3 bis 4 sterile Deckgläschen wurden dazu in Petrischalen (35 mm Durchmesser) gegeben. Auf die Deckgläschen wurden jeweils 100 µl Poly-L-Lysin-Lösung (25 µg/ml) pipettiert, so dass sie fast bis zum Rand bedeckt waren. Nach 1 h Einwirkzeit wurde die Lösung abpipettiert und die Deckgläschen bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

3.5.5 Transiente Transfektion von HEK-293-Zellen

Am Vortag wurden ca. 500 000 Zellen in 2 ml Medium in die Petrischalen mit den Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen bzw. in *Fluorodishes™* ausgesät. Nach etwa 24 h Inkubation waren 90-100% der Wachstumsfläche bedeckt (optische Konfluenz). Für die Transfektion wurden pro Schale 2 µg Plasmid-DNA mit 50 µl DMEM (ohne Serum) gemischt. Parallel wurde 5 µl *Metافectene™* vorsichtig zu 50 µl DMEM pipettiert und vorinkubiert. Die DNA-Lösung wurde sehr vorsichtig zur *Metافectene™*-Lösung gegeben und diese Mischung 20 min bei Raumtemperatur gehalten. Die so entstandenen DNA-Lipid-Komplexe wurden langsam auf die Zellen pipettiert und vorsichtig geschwenkt. Nach Inkubation für 24-30 h konnte das Ergebnis aufgrund der GFP-Fluoreszenz unter dem Mikroskop beurteilt werden.

3.6 *Expression in Allium porrum-Epidermiszellen*

Die transiente Transformation von Porree-Epidermiszellen erfolgte durch Beschießen mit DNA-Goldpartikeln (biolistische Transformation), ähnlich dem von Takeuchi *et al.* beschriebenen Verfahren mit einem einfachen selbstkonstruierten Apparat (Takeuchi

3. Methoden

et al., 1992). Hierbei wurden durch Heliumdruck von 9 bar Goldpartikel mit einem Durchmesser von 1,5-4 µm aus einem Trägerfilter (*Swinney Filter*) herausbeschleunigt und über ein Diffusorgitter in einem Vakuum von -0,8 bar auf die sich darunter befindliche Porree-Epidermis geschossen. Dabei drangen die DNA-beladenen Goldpartikel in die Probe ein. Dies bewirkte eine transiente Transformation einiger weniger Porree-Epidermiszellen.

Präparation der Goldpartikel

Etwa 50 mg Goldpartikel wurden mit 500 µl 100% Ethanol gemischt und bei 16 000 x g für 2 min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in der *SpeedVac®* getrocknet und mit 500 µl Aqua bidest. versetzt (100 µg/µl). 50 µl-Aliquots wurden zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

Vorbereiten der Porree-Epidermis

Es wurden etwa 3x3 cm große Stücke der Porree-Epidermis präpariert und einzeln auf 1,2% MS-Agar gelegt.

Präparation der DNA-Gold-Proben

Ein Aliquot der Goldsuspension wurde aufgetaut und nach kurzer Zentrifugation der Wasserüberstand entfernt. Auf das Goldpellet wurden 50 µl Plasmid-DNA (120 ng/µl) pipettiert und gevortext. Es wurden 20 µl 0,1 M Spermidinlösung und 50 µl eiskalte 2,5 M CaCl₂-Lösung zugegeben und 3 min gevortext. Nach Zugabe von 100 µl eiskaltem 100 % Ethanol und von weiteren 200 µl nach kurzem Vortexen wurde geschüttelt und die DNA-Gold-Probe 30 min bei -20°C gehalten. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abpipettiert, 50 µl Aqua bidest. hinzugegeben, resuspendiert und je 9 µl auf einen *Swinney Filter* aliquotiert.

Beschießen der Probe

Der *Swinney Filter* wurde eingeschraubt und das Diffusorgitter eingelegt. Die Agarplatte mit der vorbereiteten Porree-Epidermis wurde unter dem Gitter positioniert und die Kammer verschlossen. Nach Absinken des Kammerdruckes auf -0,8 bar wurde der Schuss ausgelöst. Nach dem Beschießen wurden die Proben im Dunkeln für 24 h inkubiert.

3.7 *In vivo pH-Messung durch Fusion der AQP1-Mutanten mit ratiometrischem pHluorin*

Prinzip

Um die Protonenpermeabilität der AQP1-Mutanten *in vivo* zu messen, wurden diese mit ratiometrischem pHluorin fusioniert (s. 3.9.3). Das ratiometrische pHluorin ist eine pH-sensitive Mutante des GFP, des *green fluorescent protein*.

Das GFP aus der Qualle *Aequorea victoria* ist ein kleines Protein mit einem Molekulargewicht von 27 kDa (Shimomura *et al.*, 1962). Es besitzt ein bimodales Anregungsspektrum mit zwei Maxima bei 395 nm und 475 nm, die dem protonierten und unprotoniertem Zustand des Tyrosin (Y66) als Bestandteil des Fluorophors entsprechen (Brejc *et al.*, 1997). Da es als Fusionspartner die Funktion des zu untersuchenden Proteins nicht beeinträchtigt, dient es als idealer Indikator für die Lokalisation von Proteinen in zahlreichen Organismen (Lippincott-Schwartz *et al.*, 2001). Durch Mutationen wurde die Fluoreszenzintensität des GFP erhöht; zusätzlich wurden pH-sensitive Mutanten (pHluorine) zur Bestimmung des pH-Wertes im Zytoplasma oder in Zellorganellen entwickelt (Takahashi *et al.*, 2001; Ashby *et al.*, 2004). Das pHluorin weist in seinem Anregungsspektrum bei 395 nm und 475 nm zwei im Bereich von pH 8 bis pH 5,5 pH-abhängige Maxima auf (s. Abb. 3.3). Das Fluoreszenzemissionsverhältnis F390/F475 bei den beiden Anregungswellenlängen verändert sich demnach reversibel abhängig vom pH-Wert (Miesenbock *et al.*, 1998).

Nach Expression der Konstrukte sollte so der Protoneneinstrom durch die AQP1-Mutanten anhand der pH-abhängigen Fluoreszenzänderung des pHluorins direkt detektiert werden.

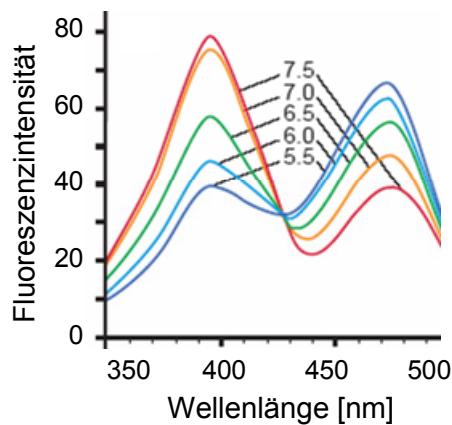


Abbildung 3.3: Anregungsspektrum von ratiometrischem pHluorin (Miesenbock et al., 1998)

Probenvorbereitung

Die mit den pHluorin-AQP1-Konstrukten transformierten *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen (s. 3.1.18) wurden vor der Messung auf SD-Agar pH 6,8 ausplattiert und 3 d bei 29°C inkubiert.

Die Hefetransformanden und die transformierten Porree-Epidermiszellen (s. 3.6) wurden vor der Messung mit Hilfe eines Fluoreszenz-Binokulars selektiert.

In vivo Messung des Fluoreszenzquotienten F390/F475

Eine Durchflusskammer mit der zu untersuchenden Probe (Porree-Epidermis bzw. Hefezellen) wurde auf einem inversen Fluoreszenzmikroskop befestigt und mit Pufferlösung perfundiert (2,4 ml/min).

Die Anregungswellenlängen betrugen 390 nm, 428 nm und 475 nm, die Emission wurde bei 535 nm gemessen. Alle 12 s wurden Fluoreszenzbilder aufgenommen. Das Signal bei 428 nm diente als Kontrolle zur Erkennung von Bewegungen der Probe oder Fokusveränderung. Es wurden pH-Gradienten mit Pufferlösungen unterschiedlicher pH-Werte eingestellt und die Fluoreszenzemissionsverhältnisse anschließend bestimmt (Gao et al., 2004; Lorenzen et al., 2004; Schulte et al., 2006).

3.8 Membranproteinexpression und -reinigung

3.8.1 Expression in *Saccharomyces cerevisiae*

AQP1-Konstrukte im Galactose induzierbaren Hefevektor pYES2 wurden zur Transformation von Hefezellen des Stammes BY4742 verwendet. Mit einer einzelnen Kolonie wurde eine 2 ml Übernachtkultur in Selektivmedium (SD Glucose) angeimpft und bei 29°C und 200 rpm inkubiert. Aus dieser Kultur wurde eine 2 l-Kultur angeimpft und unter gleichen Bedingungen gehalten, bis eine OD₆₀₀ von 1 erreicht wurde. Die Zellen wurden 5 min bei 2000 x g pelletiert und mit Aqua bidest. gewaschen. Nach dem Resuspendieren in 2 l Induziermedium (SD Galactose) wurde bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 2 bei 29°C und 200 rpm inkubiert (ca. 24 h).

3.8.2 Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA

Nach der Zellernte wurde das Pellet in 60 ml kaltem Resuspensionspuffer aufgenommen und die Zellen dreimal in einer Hochdruckzelle (*French Press*) bei einem Zelldruck von 20 000 psi (\approx 1400 bar) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden abgetrennt (1000 x g, 10 min, 4°C) und der Überstand 90 min bei 100 000 x g zentrifugiert. Das die Membranfraktion enthaltende Pellet wurde in 20 ml Bindungspuffer aufgenommen und mit dem *Dounce*-Homogenisator resuspendiert. Nach der Zugabe von weiteren 40 ml Bindungspuffer wurde für mindestens 1 h oder über Nacht inkubiert. Durch die anschließende Ultrazentrifugation (70 min bei 100 000 x g) konnten die solubilisierten Proteine im Überstand gesammelt werden. Der Überstand wurde mit 2 ml Ni²⁺-NTA, welches fünfmal mit Bindungspuffer gewaschen wurde, versetzt und über Nacht bei 4°C unter leichter Bewegung inkubiert. Diese Suspension wurde auf eine Fritte gegeben und mit insgesamt 200 ml Waschpuffer gewaschen. Eluiert wurde in zehn Fraktionen mit insgesamt 10 ml Elutionspuffer.

3.9 Klonierungsarbeiten/Mutationen

Alle generierten Konstrukte nach Klonierungen und Mutagenese wurden durch Sequenzierung überprüft (s. 3.1.12). In den Tabellen sind die verwendeten Primer mit der entsprechenden Kurzbezeichnung aufgeführt (s. 2.3).

3.9.1 Mutanten im Hefevektor pRS426MET

<i>Konstrukt im Vektor pRS426MET</i>	<i>Herstellung</i>	<i>Primer (s. 2.3)</i>
rAQP1 wt	Arbeitskreis Prof. Beitz	
rAQP1 H180A/R195V	Arbeitskreis Prof. Beitz	
rAQP1 R195V	Klonierung: <i>insert</i> : BamHI/Sall aus pOG1 rAQP1 R195V; pOG1: BamHI/Xhol	
rAQP1 N76D	Mutagenese von pRS426MET rAQP1 wt	(1)+(2)
rAQP1 N76D/R195V	Klonierung: <i>insert</i> : BamHI/Sall aus pOG1 rAQP1 N76D/R195V; pOG1: BamHI/Xhol	
rAQP1 N76D/H180A/R195V	Klonierung: <i>insert</i> : BamHI/Sall aus pOG1 rAQP1 H180A/R195V; pOG1: BamHI/Sall	
rAQP1 N192D	Mutagenese von pRS426MET rAQP1 wt	(3)+(4)
rAQP1 N76D/N192D	Mutagenese von pRS426MET rAQP1 N76D	(3)+(4)
rAQP1 N192D/H180A/R195V	Mutagenese von pRS426MET rAQP1 H180A/R195V	(5)+(6)
rAQP1 N76D/N192D/H180A/R195V	Mutagenese von pRS426MET rAQP1 N76D/H180A/R195V	(5)+(6)
rAQP1 N76S	Klonierung: <i>insert</i> : BamHI/Sall aus pOG1 rAQP1 N76S; pOG1: BamHI/Sall	
rAQP1 N76S/R195V	Klonierung: <i>insert</i> : BamHI/Sall aus pOG1 rAQP1 N76S/R195V; pOG1: BamHI/Sall	
rAQP1 N76S/H180A/R195V	Klonierung: <i>insert</i> : BamHI/Sall aus pOG1 rAQP1 N76S/H180A/R195V; pOG1: BamHI/Sall	
rAQP1 N76A	Mutagenese von pRS426MET rAQP1 wt	(9)+(10)
rAQP1 N76A/R195V	Mutagenese von pRS426MET rAQP1 R195V	(9)+(10)
rAQP1 N76A/H180A/R195V	Mutagenese von pRS426MET rAQP1 H180A/R195V	(9)+(10)

3.9.2 Mutanten im Oozytenvektor pOG1

Konstrukt im Vektor pOG1	Herstellung	Primer (s. 2.3)
rAQP1 wt	(Beitz <i>et al.</i> , 2006)	
rAQP1 R195V	(Beitz <i>et al.</i> , 2006)	
rAQP1 H180A/R195V	(Beitz <i>et al.</i> , 2006)	
rAQP1 N76D	Mutagenese von pOG1 rAQP1 wt	(1)+(2)
rAQP1 N76D/R195V	Mutagenese von pOG1 rAQP1 R195V	(1)+(2)
rAQP1 N76D/H180A/R195V	Mutagenese von pOG1 rAQP1 H180A/R195V	(1)+(2)
rAQP1 N192D	Mutagenese von pOG1 rAQP1 wt	(3)+(4)
rAQP1 N76D/N192D	Mutagenese von pOG1 rAQP1 N76D	(3)+(4)
rAQP1 N192D/H180A/R195V	Mutagenese von pOG1 rAQP1 H180A/R195V	(5)+(6)
rAQP1 N76D/N192D/H180A/R195V	Mutagenese von pOG1 rAQP1 N76D/H180A/R195V	(5)+(6)
rAQP1 N76S	Mutagenese von pOG1 rAQP1 wt	(7)+(8)
rAQP1 N76S/R195V	Mutagenese von pOG1 rAQP1 R195V	(7)+(8)
rAQP1 N76S/H180A/R195V	Mutagenese von pOG1 rAQP1 H180A/R195V	(7)+(8)
rAQP1 N76A	Mutagenese von pOG1 rAQP1 wt	(9)+(10)
rAQP1 N192A	Mutagenese von pOG1 rAQP1 wt	(11)+(12)

3.9.3 Generierung der pHluorin-AQP1-Konstrukte

In vivo cloning

Die pHluorin-AQP1-Fusionskonstrukte wurden durch homologe Rekombination (*in vivo cloning*) in *Saccharomyces cerevisiae* hergestellt. Plasmid-DNA des ratio-metrischen pHluorins (pHluorin) wurde als Ausgangsmaterial verwendet. Es wurden zunächst spezifische Primer entworfen, um das pHluorin zu amplifizieren. Durch den

3. Methoden

sense-Primer sollte zusätzlich eine homologe Sequenz des Hefevektors pRS426MET eingeführt werden. Der *antisense*-Primer wurde so konstruiert, dass das pHluorin über einen *linker* mit BgIII-Schnittstelle an das AQP1 gebunden (s. Abb. 3.4) und gleichzeitig das Stopcodon des pHluorins entfernt werden konnte. Das entstandene PCR-Produkt wurde aufgereinigt (s. 3.1.7).

Die AQP1-Konstrukte im Hefevektor pRS426MET wurden am 5'-Ende mit Spel linearisiert (s. 3.1.5) und aufgereinigt (s. 3.1.7). Jeweils 50-100 ng PCR-Produkt und linearisiertes AQP1-Konstrukt wurden zur Kotransformation in *Saccharomyces cerevisiae* (Stamm BY4742Δfps1) eingesetzt. Die Transformation erfolgte nach dem unter 3.1.18 beschriebenen Protokoll mit insgesamt 34 µl DNA-Wasser-Mischung. Einzelne Hefekolonien wurden gepickt, die isolierte Plasmid-DNA (s. 3.1.17) zur Transformation von *E. coli* verwendet (s. 3.1.15) und die gewonnene DNA sequenziert (s. 3.1.12).

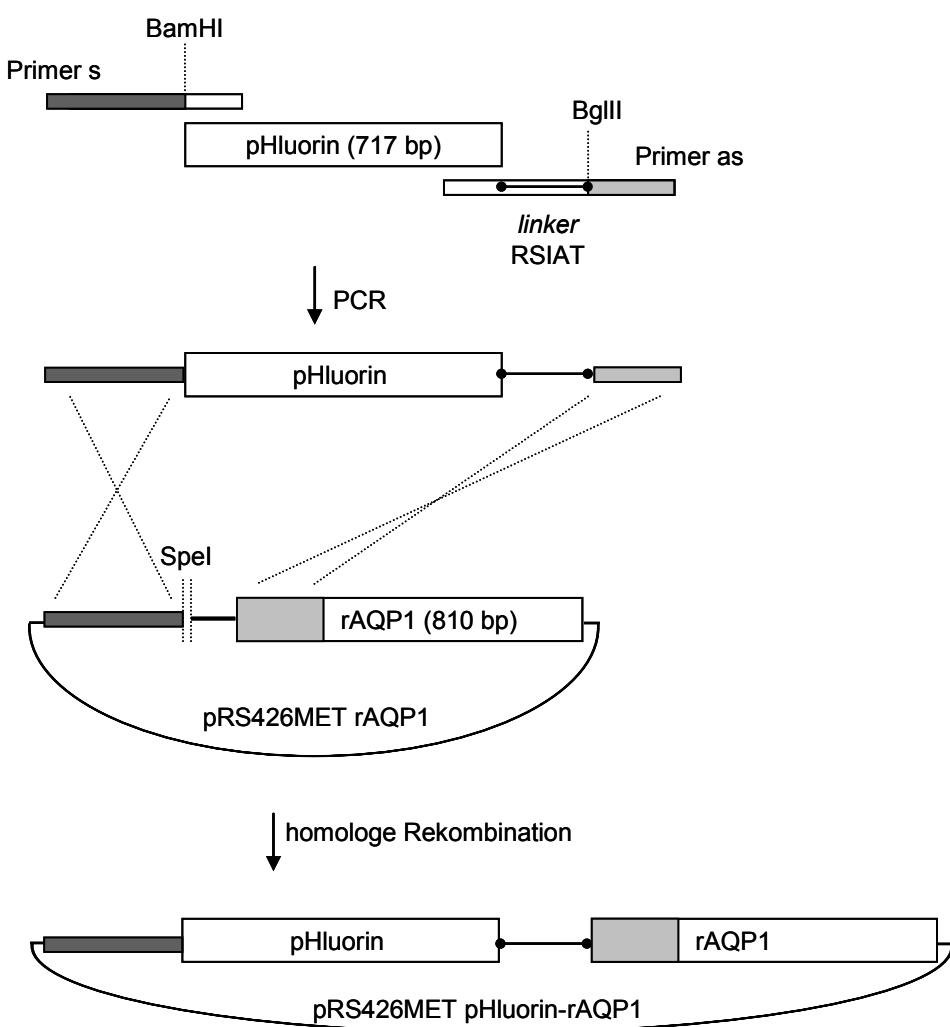


Abbildung 3.4: *In vivo cloning*

pHluorin-AQP1-Fusionskonstrukte

Die Fusionskonstrukte pHluorin-AQP1-Wildtyp und pHluorin-AQP1 H180A/R195V im Hefevektor pRS426MET konnten wie beschrieben durch *in vivo cloning* gewonnen werden. Die weiteren Mutanten wurden durch *in vitro* Mutagenese erzeugt (s. 3.1.13). Als Kontrolle wurde das pHluorin aus dem pHluorin-PCR-Produkt (s.o.) durch BamHI- und BgIII-Verdau in den BamHI geschnittenen dephosphorylierten Vektor pRS426MET kloniert (s. Tab. 3.7).

Konstrukt im Vektor pRS426MET	Konstrukt- nummer	Herstellung	Primer (s. 2.3)
pRS426MET pHluorin rAQP1 wt	(I)	<i>in vivo cloning</i> mit pRS426MET rAQP1 wt	(21)+(22)
pRS426MET pHluorin rAQP1 H180A/R195V	(II)	<i>in vivo cloning</i> mit pRS426MET rAQP1 H180A/R195V	(21)+(22)
pRS426MET pHluorin rAQP1 N76D	(III)	Mutagenese von (I)	(1)+(2)
pRS426MET pHluorin rAQP1 N192D	(IV)	Mutagenese von (I)	(3)+(4)
pRS426MET pHluorin rAQP1 N76D/H180A/R195V	(V)	Mutagenese von (II)	(1)+(2)
pRS426MET pHluorin rAQP1 N192D/H180A/R195V	(VI)	Mutagenese von (II)	(5)+(6)
pRS426MET pHluorin	(VII)	Klonierung: <i>insert:</i> BamHI/BgIII aus PCR-Produkt; pRS426MET: BamHI	

Tabelle 3.7: pHluorin und pHluorin-AQP1-Fusionskonstrukte im Hefevektor pRS426MET.

Die Konstrukte sind für den einfacheren Verweis mit fortlaufenden römischen Ziffern bezeichnet (Konstruktnummer).

Zusätzlich wurden einige Konstrukte für die Expression in Porree in den pflanzlichen Vektor pART7 gebracht (Gleave, 1992). Dazu wurden mittels PCR Schnittstellen für die Klonierung generiert (s. 3.1.6). Die Fusionskonstrukte bzw. das pHluorin im Hefevektor dienten als *template*-DNA. Die PCR-Produkte und der Vektor wurden mit den entsprechenden Enzymen verdaut (s. 3.1.5) und ligiert (s. 3.1.11). Die generierten Konstrukte sind in Tabelle 3.8 aufgeführt.

3. Methoden

Konstrukt im Vektor pART7	Herstellung	Primer (s. 2.3)	template-DNA
pART7 pHluorin rAQP1 wt	PCR (<i>insert</i>): EcoRI/XbaI; pART7: EcoRI/XbaI	(25)+(26)	(I)
pART7 pHluorin rAQP1 N76D/H180A/R195V	PCR (<i>insert</i>): EcoRI/XbaI; pART7: EcoRI/XbaI	(25)+(26)	(V)
pART7 pHluorin	PCR (<i>insert</i>): XbaI/XbaI; pART7 XbaI/XbaI	(23)+(24)	(VII)

Tabelle 3.8: pHluorin und pHluorin-AQP1-Fusionskonstrukte im Vektor pART7. Für die verwendete template-DNA ist die Konstruktnummer angegeben (s. Tab. 3.7).

Für die Expression in HEK-293-Zellen wurden einige Konstrukte in den Vektor pIRES1neo eingebracht (s. Tab. 3.9). Dazu wurde der leere Vektor zunächst aus einem im Arbeitskreis vorhandenen Konstrukt (Nr.35) durch Ausschneiden des *inserts* mit Afel und NotI, anschließender Klenow-Behandlung (s. 3.1.9) und Religation erzeugt.

Mittels PCR wurden die pHluorin-Fusionskonstrukte im Hefevektor pRS426MET amplifiziert. Über Primer wurden Schnittstellen eingeführt. Amplifikate und Vektor wurden mit den jeweiligen Restriktionsenzymen geschnitten und ligiert.

Konstrukt im Vektor pIRES1neo	Herstellung	Primer (s. 2.3)	template-DNA
pIRES1neo pHluorin rAQP1 wt	PCR (<i>insert</i>): NotI/EcoRI pIRES1neo: NotI/EcoRI	(27)+(29)	(I)
pIRES1neo pHluorin rAQP1 N76D/H180A/R195V	PCR (<i>insert</i>): NotI/EcoRI pIRES1neo: NotI/EcoRI	(27)+(29)	(V)
pIRES1neo pHluorin	PCR (<i>insert</i>): NotI/EcoRI pIRES1neo: NotI/EcoRI	(27)+(28)	(VII)

Tabelle 3.9: pHluorin und pHluorin-AQP1-Fusionskonstrukte im Vektor pIRES1neo. Für die verwendete template-DNA ist die Konstruktnummer angegeben (s. Tab. 3.7).

Desweiteren wurden die pHluorin-Fusionskonstrukte auch in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert. Dazu wurden die vorhandenen Konstrukte aus dem Vektor pRS426MET in den Vektor pOG1 überführt. Das pHluorin konnte aus dem Vektor pART7 umkloniert werden (s. Tab. 3.10).

Konstrukt im Vektor pOG1	Klonierung
pOG1 pHluorin rAQP1 wt	<i>insert aus (I): BamHI/ HindIII</i> <i>pOG1: BamHI/ HindIII</i>
pOG1 pHluorin rAQP1 N76D	<i>insert aus (III): BamHI/ Xhol</i> <i>pOG1: BamHI/ Sall</i>
pOG1 pHluorin rAQP1 N76D/H180A/R195V	<i>insert aus (V): BamHI/ HindIII</i> <i>pOG1: BamHI/ HindIII</i>
pOG1 pHluorin rAQP1 N192D/H180A/R195V	<i>insert aus (VI): BamHI/ HindIII</i> <i>pOG1: BamHI/ HindIII</i>
pOG1 pHluorin	<i>insert aus pART7 pHluorin: Xhol/ Xbal</i> <i>pOG1: Xhol/ Xbal</i>

Tabelle 3.10: pHluorin und pHluorin-AQP1-Fusionskonstrukte im Oozytenvektor pOG1. Für das verwendete *insert* ist die Konstruktnummer angegeben (s. Tab. 3.7).

3.9.4 Klonierungen für die Proteinexpression und -reinigung

Der Expressionsvektor pYES260 wurde von Euroscarf bezogen. Nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und BamHI wurde mittels Primer ein 10xHis-tag eingefügt. Diese enthielten in der Sequenz die entsprechenden geschnittenen Enden (s. 2.3, Primer (30)+(31)). Nach dem Erhitzen auf 95°C für 2 min wurde die Primermischung (10 µM) auf Raumtemperatur gebracht und ligiert.

Der offene Leserahmen von rAQP1-Wildtyp und rAQP1 N76D/H180A/R195V (aus der Ratte) wurde in den entstandenen Vektor pYES2 10xHis kloniert. Die Konstrukte wurden mit BamHI und Xbal aus dem pOG1-Vektor geschnitten und in den mit denselben Enzymen behandelten pYES2 10xHis einligiert. Die Konstrukte enthielten die Sequenz von His-tag und rAQP1 mit jeweils einem Startcodon im Leserahmen, jedoch wurde durch den aus der MCS des pOG1-Vektors stammenden *linker* ein Stopcodon zwischen die 10xHis- und die rAQP1-Sequenz eingebracht. Es wurden Primer für die Mutagenese entworfen, so dass das Stopcodon durch Punktmutation entfernt werden konnte (s. 2.3, Primer (19)+(20)).

Von Prof. Pohl (Universität Linz) wurde das Konstrukt pYES2 10xHis hAQP1 (aus dem Menschen) bereitgestellt. Dieses enthielt am 5'-Ende keine Restriktions-schnittstellen. Um hAQP1 N76D/H180A/R195V zu erzeugen, wurden drei hAQP1-spezifische Primerpaare entworfen (s. 2.3, Primer (13)-(18)). Durch dreifache *in vitro* Mutagenese entstand die Tripelmutante.

3. Methoden

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Protonenfilterfunktion der NPA-Region durch Mutationsanalyse

Durch die R195V-Mutation und die H180A/R195V-Doppelmutation in der ar/R-Region von AQP1 aus der Ratte wurden die ersten Protonen leitenden Aquaporine generiert (Beitz *et al.*, 2006). Deren Permeabilität ist mit etwa 50 Protonen pro Sekunde allerdings gering.

Von theoretisch arbeitenden Gruppen wird vermutet (de Groot *et al.*, 2003; Chakrabarti *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007a; Ko *et al.*, 2008; Phongphanphanee *et al.*, 2008), dass sich der Hauptprotonenfilter in der zentralen Engstelle des Aquaporins, der NPA-Region, befindet. Experimentelle Daten hierzu gibt es bisher jedoch nicht. Aus diesem Grund wurden auf der Suche nach dem Hauptprotonenfilter zunächst die hoch konservierten zentralen Asparagine von AQP1 aus der Ratte mutiert.

Das Einführen einer negativen Ladung durch einen Asparagin-nach-Aspartat-Austausch (AQP1 N76D bzw. AQP1 N192D) sollte die elektrostatische Barriere durch die positiven Enden der Halbhelices B und E neutralisieren. AQP1 N76D bzw. AQP1 N192D wurden dann kombiniert mit den Mutationen in der ar/R-Region, so dass die Doppelmutante AQP1 N76D/R195V und die Tripelmutanten AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V entstanden.

Weiterhin erschien es interessant, gleich zwei Aspartatreste in die zentrale Konstruktion einzuführen, um den möglichen Effekt zu verstärken (AQP1 N76D/N192D). In der Folge wurde auch eine Quadrupelmutante AQP1 N76D/N192D/H180A/R195V geschaffen.

Parallel dazu wurde ein Asparagin-nach-Serin-Austausch vorgenommen und mit den Mutationen in der ar/R-Region kombiniert (AQP1 N76S; AQP1 N76S/R195V; AQP1 N76S/H180A/R195V). Im Unterschied zum zweifachen Wasserstoffbrücken-donor Asparagin weist Serin nur ein freies Wasserstoffatom auf. Damit sollte der Einfluss einer möglichen Änderung in der Ausrichtung von Wasserstoffbrücken zum passierenden Molekül auf die Permeabilität für Protonen untersucht werden.

Mit dem Austausch des Asparagins durch Alanin wurde schließlich die Möglichkeit der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen in der NPA-Region in AQP1 N76A vollständig eliminiert.

Auch diese Mutation wurde mit AQP1 R195V und AQP1 H180A/R195V kombiniert. Die generierten Mutanten wurden exprimiert und in verschiedenen Assays charakterisiert.

Abbildung 4.1 zeigt ein Modell der NPA-Regionen von AQP1-Wildtyp und im Vergleich dazu die Mutationen N76D, N76S und N76A.

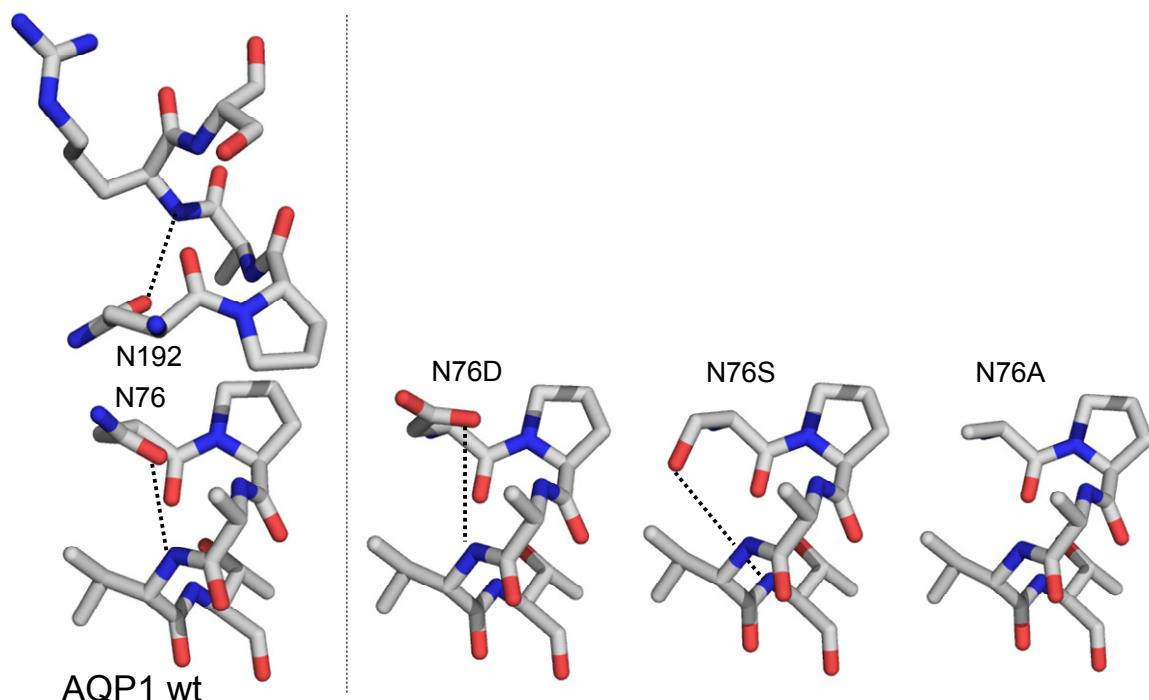


Abbildung 4.1: Modell der NPA-Regionen von AQP1-Wildtyp und den Mutanten AQP1 N76D, AQP1 N76S und AQP1 N76A mit möglichen Wasserstoffbrückenbindungen zum Peptidrücken (nach PDB #1j4n des bovinen AQP1, Nummerierung der Reste analog AQP1 aus der Ratte; Erstellung der Abbildung mit Hilfe von Pymol)

4.2 Testung der AQP1-Mutanten in *Saccharomyces cerevisiae*-Wachstumsassays

Die Mutationen in der zentralen, hoch konservierten Engstelle bedeuten einen großen Eingriff in die Molekülstruktur des Aquaporins. Funktionstests in der Hefe (phänotypische Hefeassays) sollten Aufschluss darüber geben, ob die AQP1-Mutanten richtig gefaltet und exprimiert werden.

Die Sprosshefe *Saccharomyces cerevisiae* eignet sich besonders gut für Wachstums- und Zelltoxizitätsassays, da sie wegen der kurzen Generationsdauer einfach

zu kultivieren und bei vorhandenen Selektionsmarkern in diesem eukaryotischen System die Expression von Säuger-Membranproteinen möglich ist.

Alle im Folgenden aufgeführten Wachstumsassays wurden mindestens zweimal nach erneuter Transformation des jeweiligen Hefestammes wiederholt.

4.2.1 Untersuchung der Methylamin-/Methylammonium-Permeabilität

Methylamin-Efflux-Assay

Zur Charakterisierung aller Mutanten (s. 3.9.1) wurde der Methylamin-Efflux-Assay durchgeführt (s. Abb. 4.2). Bei diesem Funktionstest zeigt Wachstum der Hefezellen eine Methylaminleitfähigkeit der heterolog exprimierten Mutanten an, da diese den Efflux von toxischem Methylamin aus der Hefezelle ermöglichen (s. 3.3.1).

Als Positivkontrolle wurde der Wildstamm BY4742 verwendet, der über das endogene Aquaglyceroporin Fps1 Methylamin ausschleusen kann. Dieser zeigte deutlich Wachstum in allen Verdünnungen bei pH 5,5 und 6,5, schwächer bei pH 7,5. Als Negativkontrollen dienten mit Leerplasmid und zusätzlich mit AQP1-Wildtyp transformierte BY4742Δfps1-Hefezellen, die auf den Methylaminplatten kein Wachstum zeigten. Für die bereits früher charakterisierten Mutanten mit veränderter ar/R-Region konnte leichtes Wachstum (AQP1 R195V) der exprimierenden Hefezellen bzw. annähernd gleich starkes Wachstum (AQP1 H180A/R195V) wie bei der Positivkontrolle bestätigt werden (Beitz *et al.*, 2006).

Die Transformanden von AQP1 N76A, AQP1 N76S, AQP1 N76D und AQP1 N192D sowie AQP1 N76D/N192D, die alle keine Veränderung in der ar/R-Region aufwiesen, wuchsen nicht. Das fehlende Wachstum der Hefezellen war hier durchaus erwartet, da der Durchmesser der unveränderten ar/R-Region für die Methylaminpassage zu eng ist (Beitz *et al.*, 2006).

Transformanden von AQP1 N76S/R195V wuchsen schwach, jene von AQP1 N76S/H180A/R195V annähernd wie die Positivkontrolle. Auch Hefezellen mit AQP1 N192D/H180A/R195V zeigten Wachstum. Dieses war jedoch nur bei pH 5,5 nachweisbar und dabei schwächer als bei Zellen mit AQP1 H180A/R195V.

Die Transformanden von AQP1 N76D/R195V, AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N76D/N192D/H180A/R195V sowie AQP1 N76A/R195V und AQP1 N76A/H180A/R195V wuchsen nicht.

Fehlendes oder schwaches Wachstum konnte unterschiedliche Ursachen haben. Es galt zu überprüfen, ob die entsprechenden Mutanten in dem Hefestamm überhaupt

4. Ergebnisse

exprimiert wurden. Außerdem war denkbar, dass einige Transformanden ihre Kationenfilterfunktion verloren hatten und nun geladenes Methylammonium entlang des steilen Gradienten in die Zelle leiteten. Die Entgiftung durch Ausstrom von Methylamin könnte in diesem Fall den Methylammoniumeinstrom nicht kompensieren.

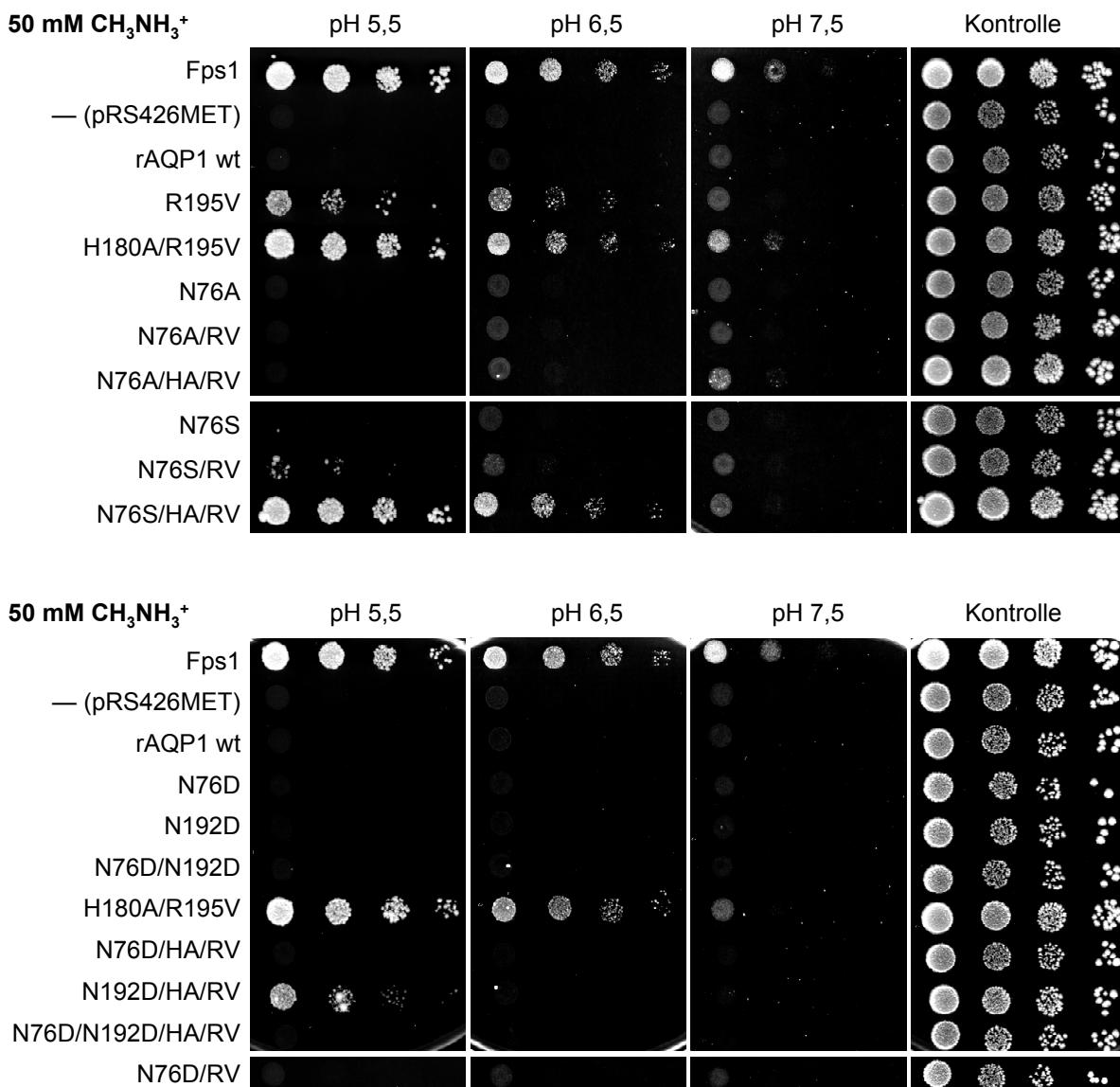


Abbildung 4.2: AQP1-Wildtyp und -Mutanten im Stamm BY4742Δfps1 sowie mit Leerplasmid transformierte BY4742Δfps1-Hefezellen (Negativkontrolle) und mit Leerplasmid transformierte Wildtyp-Hefezellen BY4742 (Positivkontrolle) wurden auf Agarplatten pH 5,5/6,5/7,5 mit 50 mM Methylamin/Methylammonium und 0,1% Prolin als Stickstoffquelle in 1:10 Verdünnungsreihen pipettiert (je 5 µl der Verdünnungen OD₆₀₀ = 1/10¹/10⁻²/10⁻³). Als Kontrolle dienten entsprechende Verdünnungen auf SD-Agar. Das Zellwachstum wurde nach 6 d dokumentiert.

Expressionskontrolle im Hefestamm BY4742 Δ fps1

Für die Expressionskontrolle im Hefestamm BY4742 Δ fps1 wurde die mikrosomale Fraktion isoliert (s. 3.3.7). Der Western Blot zeigte eindeutige Unterschiede in der Expression der Mutanten (s. Abb. 4.3):

AQP1 N76S, AQP1 N192D, AQP1 N76D/N192D/H180A/R195V, AQP1 N76A, AQP1 N76A/R195V und AQP1 N76A/H180A/R195V wurden minimal oder gar nicht exprimiert. Für die anderen Mutanten war eine eindeutige Expression nachweisbar. Folglich war das fehlende bzw. reduzierte Wachstum von AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V im Methylamin-Efflux-Assay wahrscheinlich nicht auf ein Expressions- oder Faltungsproblem zurückzuführen. Eine potentielle Leitfähigkeit dieser Mutanten für geladenes Methylammonium wurde daher weiter untersucht.

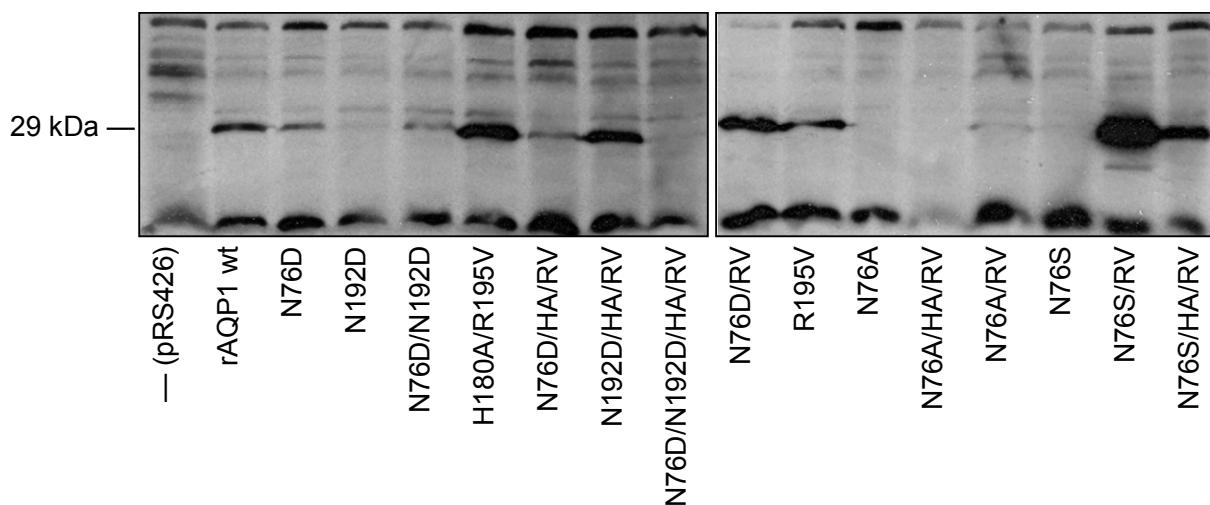


Abbildung 4.3: Western Blot der Totalmembranfraktion der AQP1-Mutanten exprimierenden Hefezellen des Stammes BY4742 Δ fps1. Aufgetragen wurden jeweils 10 µg Gesamtprotein pro SDS-PAGE-Spur. Detektiert wurde mit Antiserum gegen AQP1 in einer 1:1000 Verdünnung.

Methylammonium-Aufnahme-Assay

Um genauer zu bestimmen, ob das reduzierte bzw. nicht vorhandene Wachstum der Transformanden beim Methylamin-Efflux-Assay auf die Aufnahme von geladenem Methylammonium zurückzuführen war, wurden die Tripelmutanten AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V im Hefestamm 31019 Δ fps1 auf Methylamin-Agarplatten ausplattiert (s. Abb. 4.4). Da in diesem Hefestamm neben dem Aquaglyceroporin Fps1 auch die endogenen Ammonium-

4. Ergebnisse

transporter Mep1-3 deletiert sind, müssten Transformanden, die das bei pH 5,5 im Überschuss vorliegende geladene Methylammonium leiten, ein schwächeres Wachstum zeigen. Tatsächlich wiesen die Zellen mit AQP1 N76D/H180A/R195V ein deutlich reduziertes Wachstum auf. Bei AQP1 N192D/H180A/R195V-Transformanden war keine Wachstumsreduktion zu erkennen. Hefezellen, welche die Methylamin leitende Mutante AQP1 H180A/R195V und AQP1-Wildtyp exprimierten, wuchsen wie nicht exprimierende Zellen.

Das Wachstumsverhalten der AQP1 N76D/H180A/R195V-Transformanden in den Methylamin-Assays war ein erster Hinweis auf eine potentielle Leitfähigkeit für geladenes Methylammonium, so dass sich Testungen für weitere Kationen anschlossen.

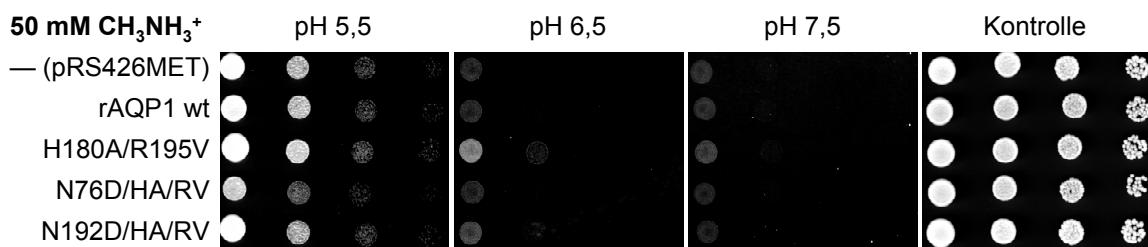


Abbildung 4.4: Transformanden des Hefestammes 31019Δfps1 in 1:10 Verdünnungsreihen auf Agarplatten mit 50 mM Methylamin/Methylammonium nach 3 d Inkubation. Reduziertes Wachstum kann auf eine Methylammonium-Leitfähigkeit hinweisen. Rechts ist das Kontrollwachstum der Verdünnungsreihen auf SD-Agar gezeigt.

4.2.2 Untersuchung der Ammoniak-/Ammoniumpermeabilität

Ammoniak-/Ammoniumaufnahmeassay

Der Ammoniak-/Ammoniumaufnahmeassay sollte über verstärktes Wachstum von Hefezellen des Stammes 31019Δfps1 die Aufnahme von Ammoniak oder geladenem Ammonium durch heterolog exprimierte Aquaporine anzeigen (s. 3.3.2).

Von den getesteten Ammoniumkonzentrationen im Medium wurde das deutlichste Muster mit 4 mM Ammonium erzielt. Höhere Werte führten zu starkem Wachstum aller Proben einschließlich der Negativkontrolle, bei niedrigeren Konzentrationen war das Gesamtwachstum zu gering.

Als Positivkontrolle diente der Ammoniumtransporter LeAMT1;1 aus der Tomate. Ein leichtes Hintergrundwachstum aufgrund von Ammoniakdiffusion durch die Zell-

membran war auch bei der Negativkontrolle, d.h. den mit Leerplasmid transformierten Hefezellen, deutlich sichtbar (s. Abb. 4.5).

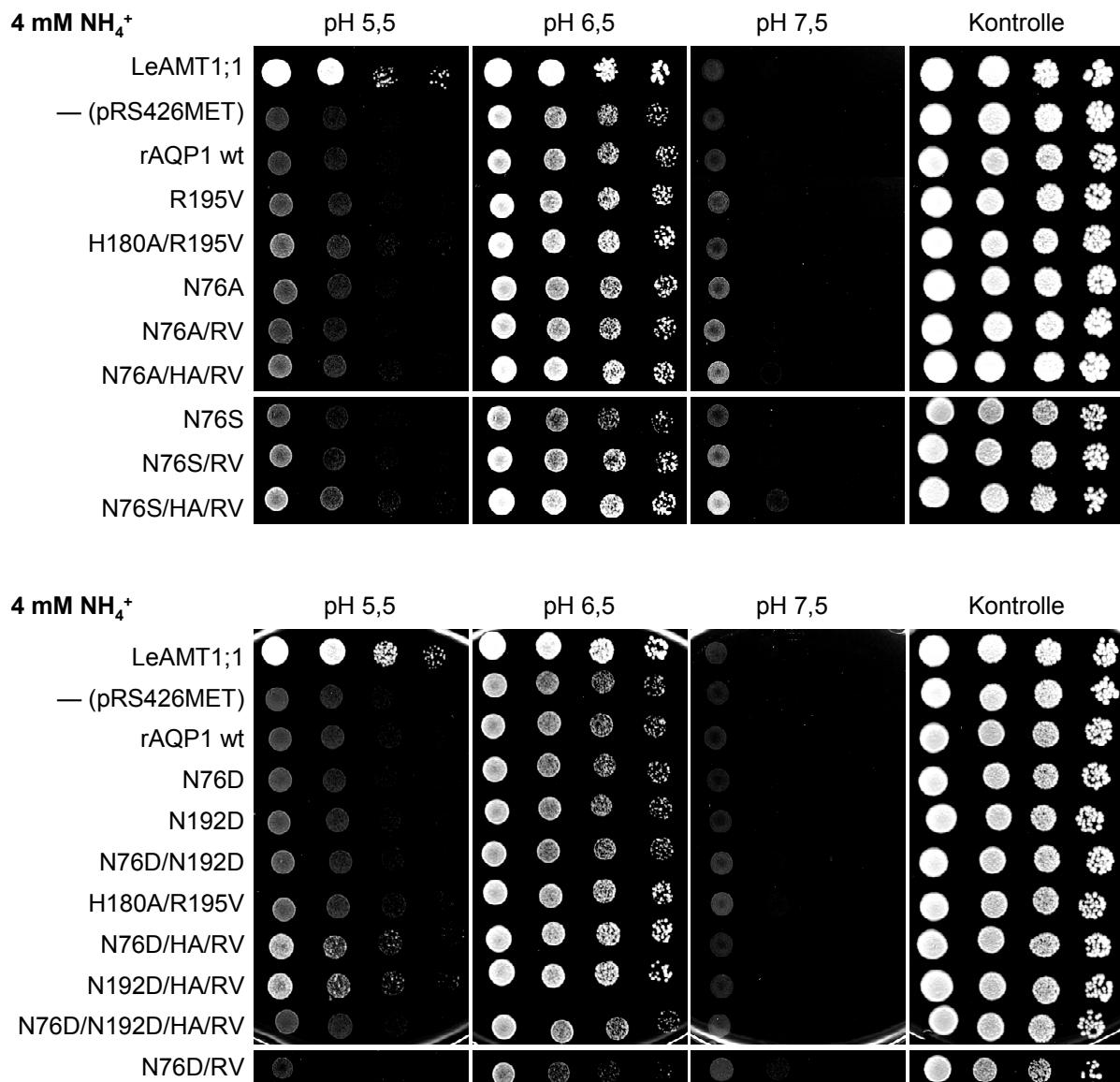


Abbildung 4.5: Ammoniak-/Ammoniumaufnahmeassay der AQP1-Mutanten im Hefestamm 31019Δfps1 auf Agarplatten mit 4 mM Ammonium bei den angegeben pH-Werten. Aufgetragen sind 1:10 Verdünnungen der jeweiligen Transformanden, ausgehend von einer OD₆₀₀ von 1. Rechts wurden entsprechende Verdünnungen auf SD-Kontrollmedium pipettiert. Die Platten wurden nach 6 d gescannt.

Bestätigt werden konnte die schwache Ammoniakpermeabilität von AQP1 R195V und die stärkere Permeabilität von AQP1 H180A/R195V (Beitz *et al.*, 2006). Die AQP1 N76A/H180A/R195V-Transformanden zeigten auf den Ammoniumplatten ein

4. Ergebnisse

leicht verstärktes Wachstum, allerdings auch auf der Kontrollplatte. Deutlicher zu erkennen war die Ammoniakleitfähigkeit von AQP1 N76S/H180A/R195V.

Auffallend war das starke Wachstum der Zellen mit AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V, welches von pH 6,5 zu pH 5,5 im Vergleich zum Hintergrund zunahm und damit auf eine Leitfähigkeit für geladenes Ammonium hindeutete.

Ammoniak-/Ammoniumaufnahmeassay auf einer pH-Gradienten-Platte

Auf einer pH-Gradientenplatte von pH 4 bis pH 8 (Maresova und Sychrova, 2005) mit 4 mM Ammonium wurden die Mutanten AQP1 N76D, AQP1 N76S, AQP1 N76D/R195V, AQP1 N76S/R195V, AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N76S/H180A/R195V erneut im Vergleich zu AQP1 R195V und AQP1 H180A/R195V getestet (s. Abb 4.6).

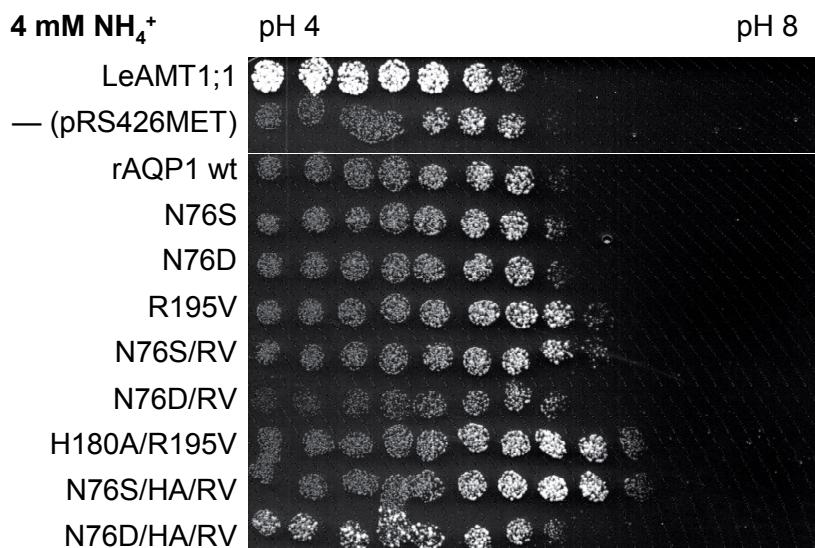


Abbildung 4.6: Ammoniak-/Ammoniumaufnahmeassay der AQP1-Mutanten im Hefestamm 31019 Δ fps1 auf einer pH-Gradientenplatte (pH 4-8) mit 4 mM Ammonium. Es wurden jeweils 10 μ l einer Zellsuspension mit $OD_{600} = 0,05$ aufgetragen und nach 3 d gescannt.

Analog der vorherigen Experimente zeigten AQP1 H180A/R195V und auch AQP1 N76S/H180A/R195V deutliche Permeabilität für Ammoniak (Wachstum bei neutralem pH-Wert in der Mitte der Platte). In diesem Test wiesen auch die Transformanden AQP1 R195V und AQP1 N76S/R195V leicht verstärktes Wachstum in diesem pH-Bereich auf.

Die Tripelmutante AQP1 N76D/H180A/R195V zeigte ein deutlich anderes Bild, nämlich verstärktes Wachstum im sauren Bereich, ähnlich dem Ammoniumtrans-

porter LeAMT1;1. Damit konnte eine Permeabilität von AQP1 N76D/H180A/R195V für geladene Ammoniumionen bestätigt werden.

Expressionskontrolle im Hefestamm 31019Δfps1

Der Western Blot der mikrosomalen Fraktion zeigte deutliche Expression fast aller Mutanten im Hefestamm 31019Δfps1 (s. Abb. 4.7). Das Signal der beiden Ammoniumionen leitenden Mutanten AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V war vergleichbar stark.

Wie im Stamm BY4742Δfps1 (s. Abb. 4.3) wurden jedoch die Mutanten AQP1 N76A und AQP1 N76A/H180A/R195V nicht, AQP1 N76A/R195V nur schwach exprimiert. Dies deutete auf ein Problem bei der Proteinfaltung durch den Asparagin-nach-Alanin-Austausch hin. Alle weiteren Mutanten wurden exprimiert, zum Teil aber deutlich schwächer als AQP1-Wildtyp.

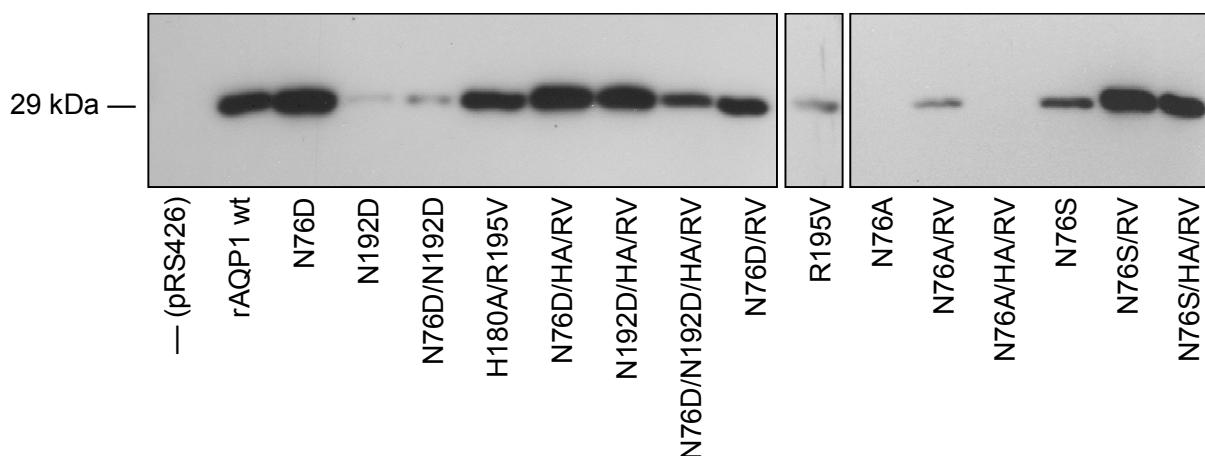


Abbildung 4.7: Western Blot der Totalmembranfraktion von AQP1-Mutanten exprimierenden Zellen des Hefestammes 31019Δfps1. Es wurde jeweils 10 µg Gesamtprotein pro SDS-Spur aufgetragen. Detektiert wurde mit Antiserum gegen AQP1 in einer 1:1000 Verdünnung.

4.2.3 Untersuchung der Kaliumionenpermeabilität

Kaliumaufnahmeassay

Der Kaliumaufnahmeassay wurde mit dem Ziel entwickelt, eine denkbare Permeabilität der Ammoniumionen leitenden Mutanten AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V für anorganische Kationen wie Kaliumionen zu detek-

4. Ergebnisse

tieren. Ammonium- und Kaliumionen sind sich in Ionenradius (1,43 Å bzw. 1,33 Å) und Hydrathülle sehr ähnlich.

Getestet wurden alle Mutanten auf AP-Minimalmedium-Agaroseplatten (s. 3.3.3) mit 0,1/0,5/1/2 mM KCl. Zellen des verwendeten Hefestammes CY162 mit deletierten endogenen Kaliumkanälen können bei minimalen Kaliumkonzentrationen des Mediums nicht wachsen (Negativkontrolle). In der Positivkontrolle leitet der Kaliumkanal AtKAT1 aus *Arabidopsis thaliana* auch bei geringsten Kaliummengen im Medium genügend K⁺-Ionen in die Hefezellen, um diesen das Wachstum zu ermöglichen (s. Abb. 4.8).

Im Test wurde deutlich, dass bereits bei einer KCl-Konzentration von 0,5 mM die Zellen mit AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V Wachstum zeigten. Das bedeutete, dass durch diese Mutanten eine für das Überleben der Hefe ausreichende Menge Kalium in die Zelle gelangte. Dieses Ergebnis beschreibt die ersten Kaliumionen leitenden Aquaporinmutanten.

Für alle weiteren Mutanten (nicht alle Daten gezeigt) konnte keine Kaliumionenpermeabilität nachgewiesen werden; sie verhielten sich wie die Negativkontrolle bzw. wie der wasserspezifische AQP1-Wildtyp. Das Wachstumsverhalten der Transfomanden glich sich bei steigenden Kaliumkonzentrationen im Medium an, da Kaliumionen dann über unspezifische Kanäle (z.B. NSC1) in ausreichender Menge in die Zellen gelangen konnten.

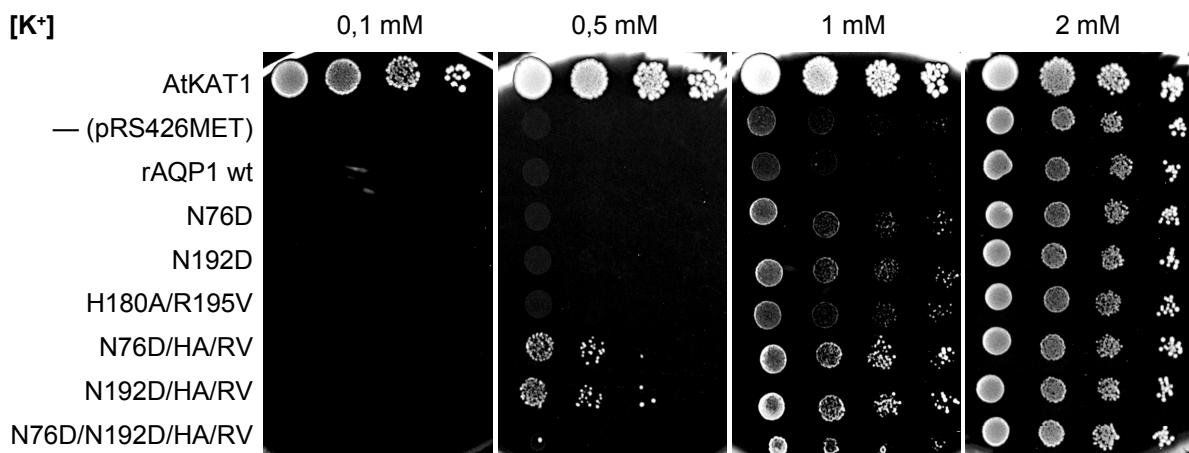


Abbildung 4.8: Kaliumaufnahmeassay: AQP1-Mutanten im Hefestamm CY162 auf AP-Minimalmedium mit 0,1/0,5/1/2 mM KCl in den Verdünnungen $OD_{600} = 1/10^{-1}/10^{-2}/10^{-3}$; Scan nach 5 d

Expressionskontrolle im Hefestamm CY162

Für den Vergleich der Expressionsniveaus der Kaliumionen leitenden Tripelmutanten AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V mit AQP1-Wildtyp und AQP1 H180A/R195V wurde die mikrosomale Fraktion der exprimierenden Hefezellen isoliert und nach SDS-Gelelektrophorese mittels Western Blot analysiert.

Abbildung 4.9 zeigt eine gleich starke Expression von AQP1-Wildtyp und AQP1 H180A/R195V; AQP1 N76D/H180A/R195V weist im Vergleich 90% und AQP1 N192D/H180A/R195V 120% Signalstärke auf.

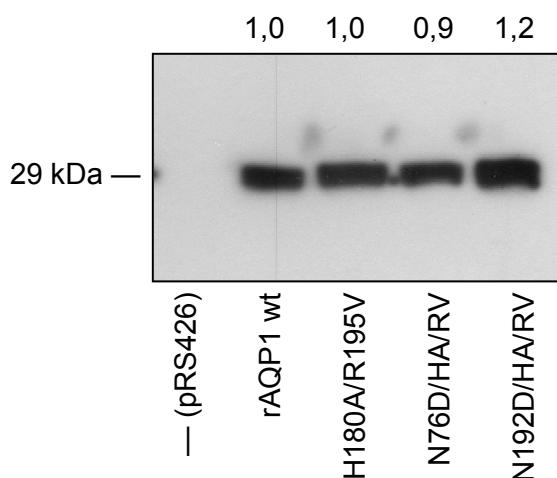


Abbildung 4.9: Western Blot von AQP1-Wildtyp, AQP1 H180A/R195V, AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V im Hefestamm CY162. Als Negativkontrolle diente mit Leerplasmid transformierte Hefe. Pro Spur wurde 10 µg Gesamtprotein aufgetragen und mit AQP1-Antikörper (1:1000) detektiert. Die Zahlen indizieren das Verhältnis der Expression bezogen auf AQP1-Wildtyp (Quantifizierung mit ImageJ).

4.2.4 Untersuchung der Natriumionenpermeabilität

Natriumstresstest

Natriumionen besitzen im Vergleich zu Kaliumionen eine stärker gebundene Hydrathülle. Sie müssen daher für eine Kanalpassage unter höherem Energieaufwand dehydratisiert werden. Alternativ ist ein größerer Kanaldurchmesser notwendig, um auch nicht vollständig dehydratisierte Natriumionen zu leiten.

Um AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V auf Natriumionenpermeabilität zu überprüfen, wurde ein Stresstest (s. 3.3.4) mit dem natriumsensitiven Hefestamm MA5 durchgeführt (Benito *et al.*, 2004).

4. Ergebnisse

Wegen fehlender Na^+ -Effluxsysteme werden diese Zellen bei Natriumioneneinstrom durch steigende intrazelluläre Natriumkonzentrationen geschädigt (Banuelos *et al.*, 1998). Alle Transformanden wurden auf Minimalmedium mit NaCl-Zusatz ausplattiert (s. Abb. 4.10).

Bei AQP1 N76D/H180A/R195V konnte eine Natriumionenpermeabilität festgestellt werden: Die Transformanden wiesen bei allen Konzentrationen ein deutlich reduziertes Wachstum im Vergleich zu den Kontrollen auf.

Die mit AQP1 N192D/H180A/R195V transformierten Hefen zeigten diesen Effekt nicht.

Es wurden alle weiteren Mutanten getestet (nicht alle Testplatten gezeigt), jedoch war das Wachstum der jeweiligen Transformanden vergleichbar mit Leerplasmid transformierten Hefezellen. Eine höhere Natriumkonzentration im Medium wirkte auf alle Zellen proliferationshemmend.

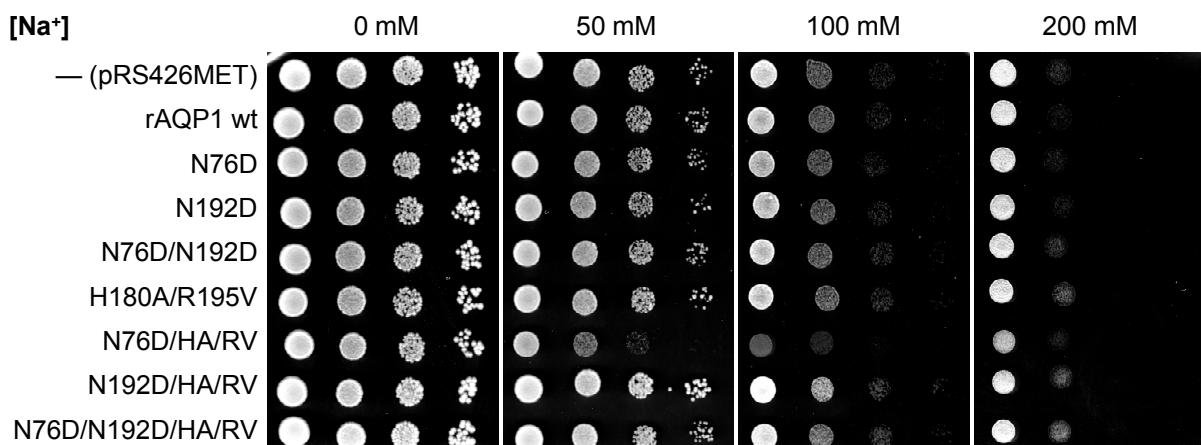


Abbildung 4.10: Natriumstresstest mit den AQP1-Mutanten im Hefestamm MA5 auf AP-Minimalmedium ohne NaCl-Zusatz und mit 50/100/200 mM NaCl. Es wurden jeweils 5 μl Zellsuspension der OD_{600} von 1 und deren 1:10 Verdünnungen $OD_{600} = 10^{-1}/10^{-2}/10^{-3}$ für jede Mutante pipettiert. Detektiert wurde nach 3 d.

Wachstumskurven unter Na^+ -Stress

Mit dem Bioscreen (s. 3.3.6) wurden Wachstumskurven ausgewählter MA5-Transformanden in AP-Minimalmedium mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen über 120 h aufgezeichnet. Abbildung 4.11 zeigt die Wachstumskurven der Hefezellen mit AQP1 H180A/R195V, AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V sowie AQP1-Wildtyp.

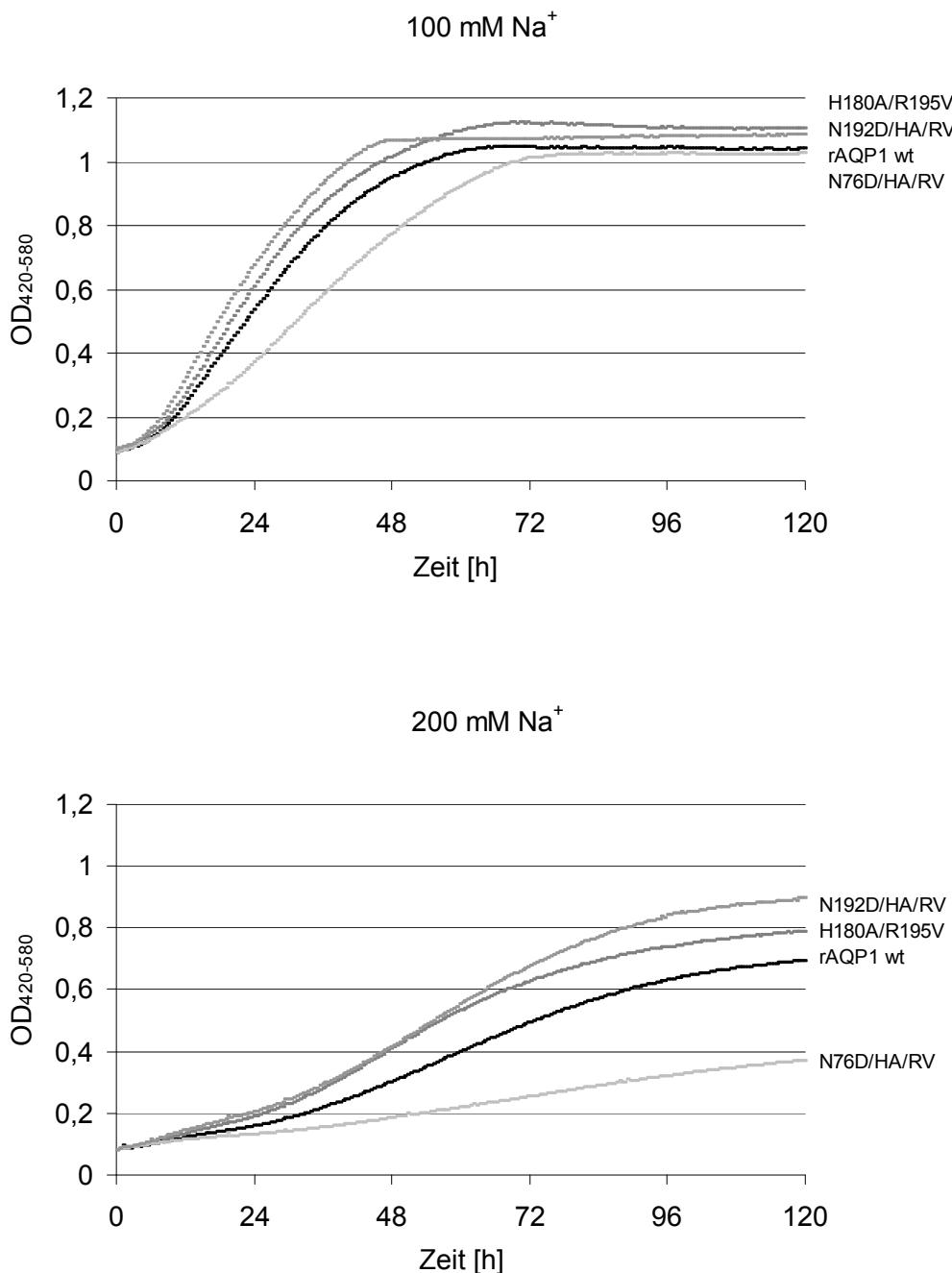


Abbildung 4.11: Mit dem Bioscreen aufgezeichnete Wachstumskurven der MA5-Hefetransformanden von AQP1-Wildtyp und von AQP1 H180A/R195V, AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V in AP-Minimalmedium mit 100 bzw. 200 mM NaCl über 120 h

Die Proliferation der Transformanden von AQP1 N76D/H180A/R195V wurde deutlich gehemmt: Bei einer Konzentration von 100 mM NaCl wuchsen diese langsamer, erreichten dann jedoch die maximale optische Dichte ($OD_{420-580} > 1$) der anderen Transformanden. Die Wachstumsgeschwindigkeit sank bei Verdoppelung der NaCl-

4. Ergebnisse

Konzentration nochmals deutlich, außerdem wurde nach 120 h verglichen mit AQP1-Wildtyp ein nur halb so großer OD₄₂₀₋₅₈₀-Wert erreicht.

Insgesamt wurde die Proliferation aller Hefezellen durch höhere NaCl-Konzentrationen verlangsamt. Bei einer Konzentration von 400 mM NaCl wuchsen alle getesteten Transformanden nicht mehr.

Eine Übersicht über die AUC-Werte nach 120 h bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen zeigt Abbildung 4.12. Die AUC der AQP1 N76D/H180A/R195V-Transformanden bei 100 mM NaCl ist um 15% reduziert im Vergleich zu AQP1-Wildtyp, bei 200 mM um 60%.

Auffällig ist, dass die AUC-Werte für die Hefezellen mit AQP1 H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V in allen Medien mit NaCl-Zusatz etwas höher sind im Vergleich zu AQP1-Wildtyp.

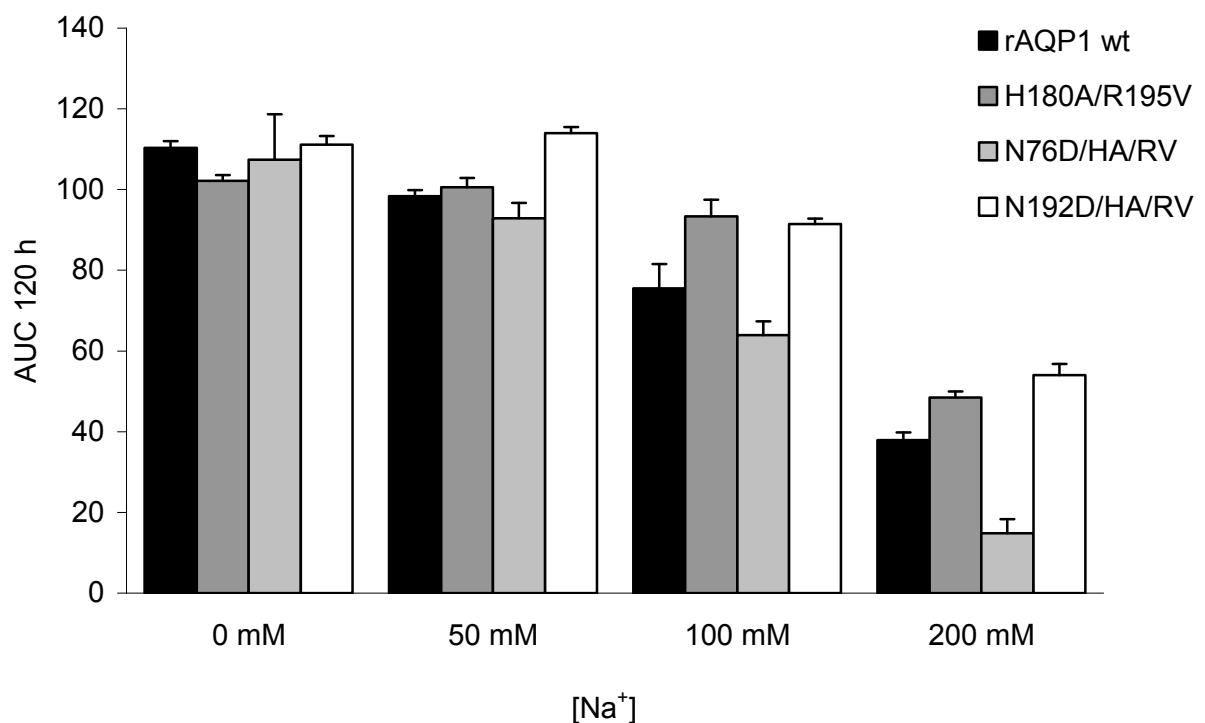


Abbildung 4.12: Gesamt-AUC (nach 120 h) der MA5-Transformanden von AQP1-Wildtyp, AQP1 H180A/R195V, AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V in AP-Minimalmedium mit 0/50/100/200 mM NaCl

Expressionskontrolle im Hefestamm MA5

Wie im Western Blot der mikrosomalen Fraktion (s. Abb. 4.13) deutlich wird, waren die Expressionsraten im Hefestamm MA5 mit 80% für AQP1 N76D/H180A/R195V und 70% für AQP1 N76D/H180A/R195V im Verhältnis zum Wildtyp vergleichbar. AQP1 H180A/R195V wurde mit 40% deutlich geringer exprimiert.

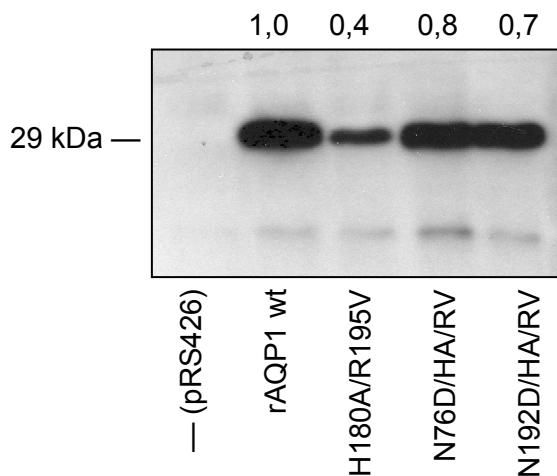


Abbildung 4.13: Western Blot von AQP1-Wildtyp, AQP1 H180A/R195V, AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V im MA5-Hefestamm. Aufgetragen wurde 10 µg Gesamtprotein pro Spur, detektiert wurde mit AQP1-Antikörper (1:1000). Die Zahlen indizieren das Verhältnis der Expression bezogen auf AQP1-Wildtyp (Quantifizierung mit ImageJ).

4.2.5 Untersuchung der Protonenpermeabilität

pH-Stresstest

Für die Testung der Aquaporinmutanten auf Protonenpermeabilität wurde ein pH-Stresstest entwickelt. *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen können auf Änderung des pH-Wertes im Medium sehr gut reagieren, da sie bei H⁺-Stress Protonen über ATP-getriebene Pumpen aktiv aus der Zelle schleusen (Martinez-Munoz und Kane, 2008). Ein Protoneneinstrom über die Aquaporinmutanten würde durch vermindertes Wachstum aufgrund des erhöhten Energieverbrauchs sichtbar (s. 3.3.5).

Es wurde zunächst der Hefestamm BY4742Δfps1 verwendet und anfangs erfolglos auf SD-Glucose- bzw. SD-Galactose-Platten getestet. Nach der Umstellung auf AP-Minimalmedium mit pH 3-6 und auf den Hefestamm CY162 wurde jedoch ein pH-Stress detektierbar (s. Abb. 4.14).

4. Ergebnisse

Für AQP1 H180A/R195V konnte die bereits beschriebene Protonenleitfähigkeit (Beitz *et al.*, 2006) phänotypisch bei pH 3 bestätigt werden.

Auch die Transformanden von AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V zeigten leicht vermindertes Wachstum bei pH 3, was auf eine Protonenpermeabilität hindeutete.

Insgesamt war der physiologische Effekt der unterschiedlichen pH-Werte auf das Wachstum der Hefen sehr schwach ausgeprägt. Die AQP1 N76D/R195V-Transformanden zeigten hier wie in anderen Hefewachstumsassays stark eingeschränktes Wachstum auch unter Normalbedingungen.

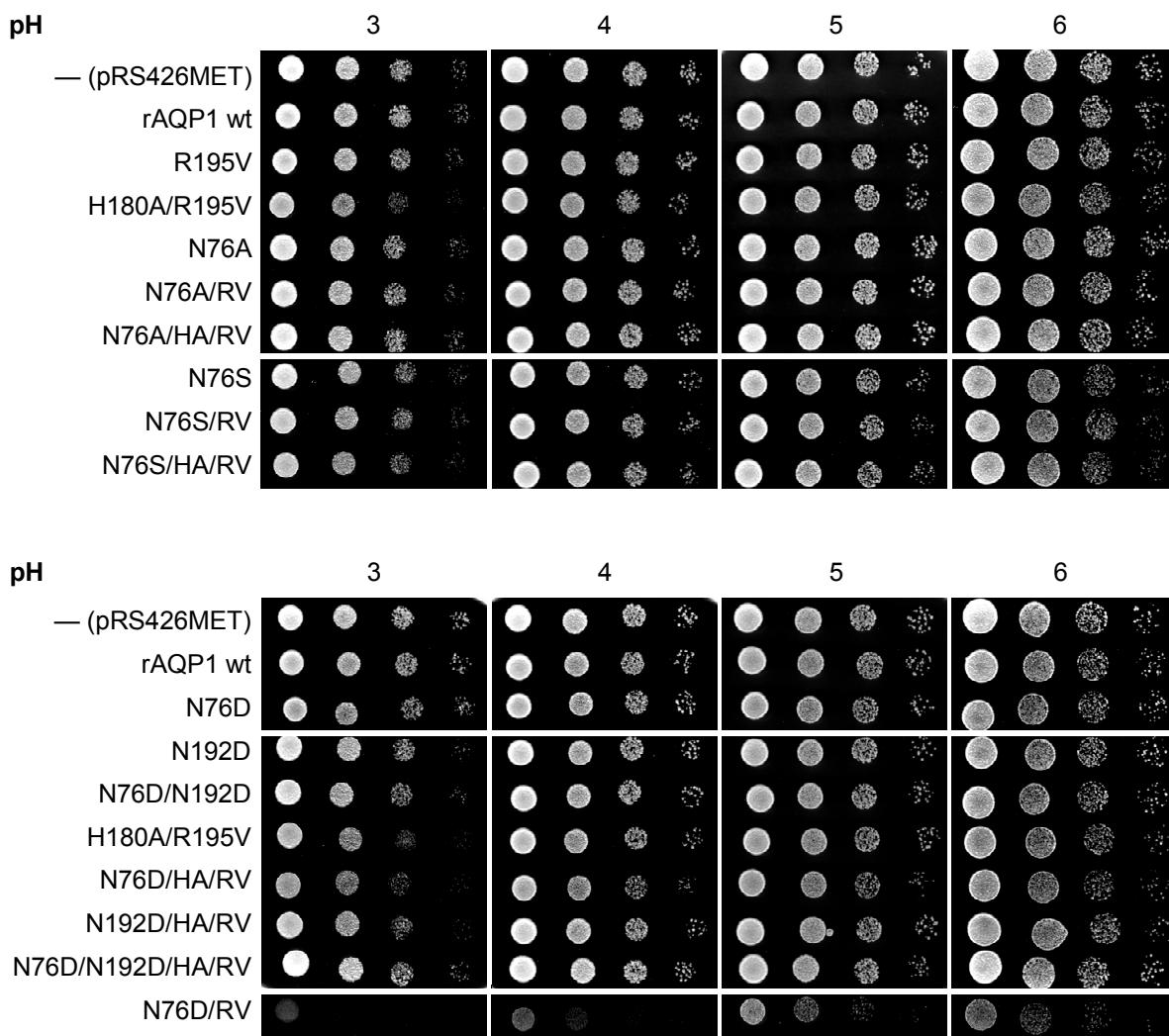


Abbildung 4.14: pH-Stresstest in AP-Minimalmedium bei unterschiedlichen pH-Werten nach 3 d Inkubation. Aufgetragen sind 1:10 Verdünnungen der Hefetransformanden ausgehend von einer OD₆₀₀ von 1.

Wachstumskurven unter pH-Stress

Um die beschriebenen Ergebnisse zur Protonendurchlässigkeit zu bestätigen, wurden Wachstumskurven der AQP1-Hefetransformanden bei unterschiedlichen pH-Werten mit dem *Bioscreen* (s. 3.3.6) aufgezeichnet (s. Abb. 4.15).

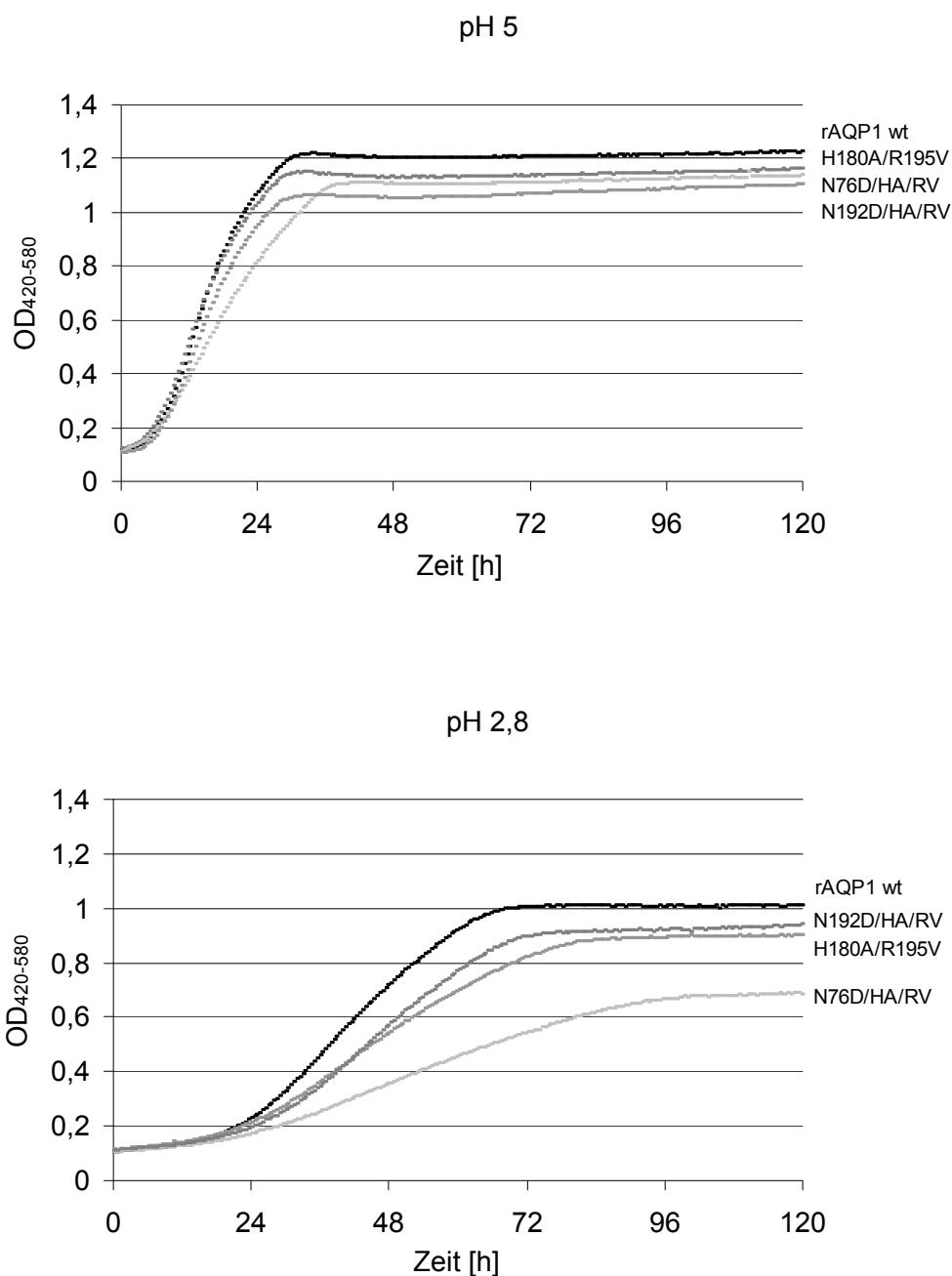


Abbildung 4.15: Wachstumskurven der CY162-Transformanden von AQP1-Wildtyp, AQP1 H180A/R195V, AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V bei pH 5 und pH 2,8 über einen Zeitraum von 120 h

4. Ergebnisse

Wie anhand der beiden Wachstumskurven zu sehen ist, waren bei pH 5 keine deutlichen Unterschiede im Wachstumsverhalten zu erkennen. Unter erhöhtem pH-Stress (pH 2,8) zeigte sich ein deutlich gehemmtes Wachstum der AQP1 N76D/H180A/R195V-Transformanden sowie eine verzögerte Proliferation der Hefezellen mit AQP1 N192D/H180A/R195V und AQP1 H180A/R195V im Vergleich zu AQP1-Wildtyp. pH-Werte unter 2,8 tolerierten alle Hefezellen nicht.

In Abbildung 4.16 sind die AUC-Werte nach 72 h dargestellt. Unterschiede im Wachstumsverhalten fanden sich auch in der Auswertung der AUC-Werte nur bei erhöhtem pH-Stress (pH 3 bzw. 2,8).

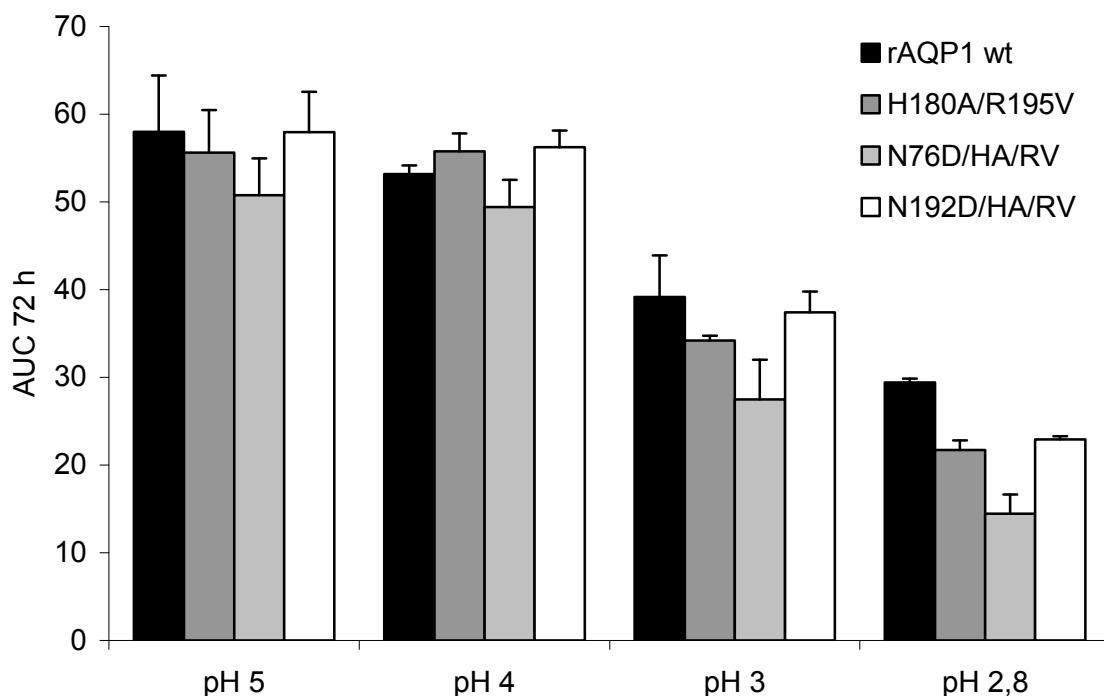


Abbildung 4.16: AUC-Werte von AQP1-Wildtyp, AQP1 H180A/R195V, AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V exprimierenden Hefezellen des Stammes CY162 nach 72 h Wachstum in AP-Medium bei pH 5/4/3/2,8

Erneut zeigten die Transformanden von AQP1 N76D/H180A/R195V die größte pH-Empfindlichkeit. Auch die Zellen mit AQP1 N192D/H180A/R195V und AQP1 H180A/R195V wuchsen deutlich gehemmt. Die AUC-Werte waren bei pH 2,8 um 50% (AQP1 N76D/H180A/R195V) bzw. um 25% (AQP1 H180A/R195V,

AQP1 N192D/H180A/R195V) reduziert im Vergleich zu AQP1-Wildtyp exprimierenden Hefezellen.

Dass Transformanden der AQP1-Mutanten empfindlicher auf pH-Stress reagieren als die Kontrolle, deutet auf eine Protonenpermeabilität hin. Dieses Wachstumsverhalten bestätigt das mit Agarmedien gefundene Ergebnis.

4.3 Charakterisierung der AQP1-Mutanten in *Xenopus laevis* Oozyten

Zur weiteren Charakterisierung von AQP1 N76D, AQP1 N192D, AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V wurde die Permeabilität der Mutanten für Wasser und unterschiedliche Solute im Vergleich zu AQP1 H180A/R195V und AQP1-Wildtyp bestimmt. Die Messungen erfolgten mit Hilfe von *Xenopus* Oozyten-Schwelltests. Wegen der interindividuellen Variabilität der Oozyten wurde der Messfehler durch einen Probenumfang von jeweils mindestens acht Zellen reduziert. Im Vorfeld wurde die dafür synthetisierte cRNA auf Größe und Reinheit überprüft.

4.3.1 cRNA-Synthese

Die kodierende DNA für die AQP1-Mutanten wurde in den pOG1-Vektor (s. 2.4) zwischen die 5'- und 3'-untranslatierten Bereiche des *Xenopus* β-Globin-Gens kloniert. Diese DNA diente als Matrize für die Synthese von cRNA, die zur Proteinexpression in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert wurde. Die Synthese der cRNA wurde mit der T7-RNA-Polymerase durchgeführt (s. 3.4.2). Abbildung 4.17 zeigt die cRNA der AQP1-Mutanten auf einem denaturierenden RNA-Gel (s. 3.1.3) zur Qualitätskontrolle.

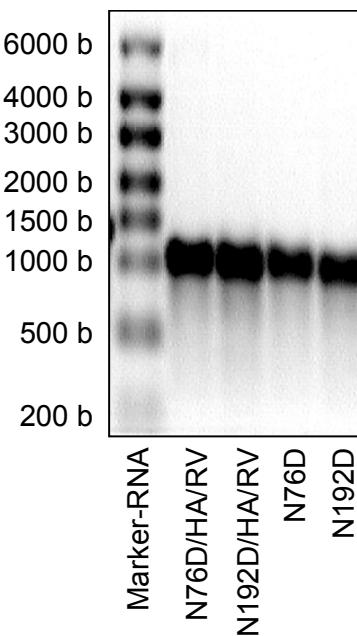


Abbildung 4.17: Trennungsmuster der cRNA der AQP1-Mutanten auf einem denaturierenden Agarosegel. Aufgetragen wurden je 500 ng cRNA. Zum Größenvergleich wurde links Marker-RNA aufgetragen.

4.3.2 Messung der Wasserpermeabilität

Osmotische Wasserpermeabilität der AQP1-Mutanten

Die Wasserpermeabilität der Mutanten AQP1 N76D, AQP1 N192D, AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V im Vergleich zu AQP1 H180A/R195V und AQP1-Wildtyp wurde in *Xenopus* Oozyten-Schwelltests ermittelt (s. 3.4.4).

Xenopus laevis Oozyten eignen sich besonders für Wasserpermeabilitätsbestimmungen, da sie eine sehr niedrige intrinsische Wasserdurchlässigkeit besitzen (Fischbarg *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1990). Für den Test wurden die Oozyten abrupt in 1:3 verdünnten ND96-Puffer überführt und so einem einwärts gerichteten osmotischen Gradienten von 140 mosM ausgesetzt.

Abbildung 4.18 zeigt die Schwellkurven von AQP1-Mutanten bzw. AQP1-Wildtyp exprimierenden Oozyten im Vergleich zu ND96-Puffer injizierten Kontrolloozyten.

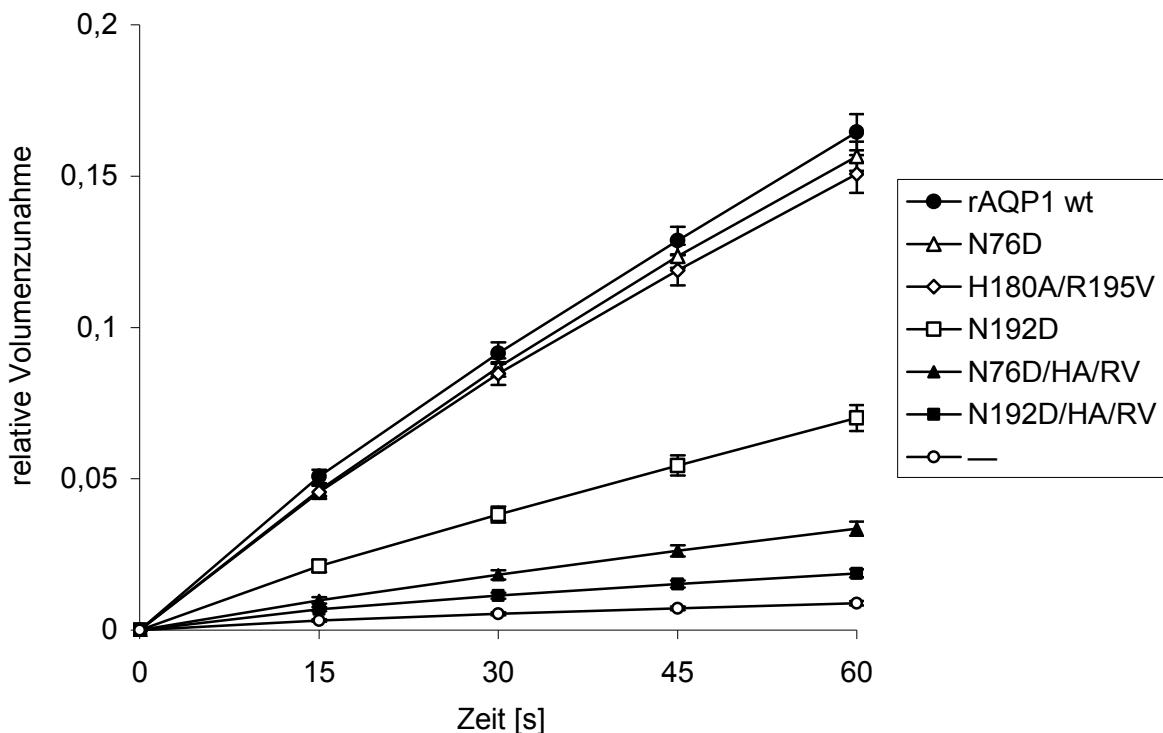


Abbildung 4.18: Oozyten-Schwelltest zur Bestimmung der osmotischen Wasserpermeabilität. Dargestellt ist die relative Volumenänderung der Oozyten in Abhängigkeit von der Zeit. Die Oozyten wurden mit ND96-Puffer injiziert (Negativkontrolle) bzw. mit cRNA kodierend für AQP1-Wildtyp und die AQP1-Mutanten H180A/R195V, N76D, N192D, N76D/H180A/R195V und N192D/H180A/R195V. Gemessen wurde in 1:3 verdünntem ND96-Puffer.

Aus der Volumenänderung der Oozyten konnten die P_f -Werte berechnet werden (s. 3.4.4). Die osmotische Wasserpermeabilität von AQP1 N76D war vergleichbar mit AQP1-Wildtyp und AQP1 H180A/R195V, die von AQP1 N192D betrug lediglich 40%. Besonders die getesteten Tripelmutanten zeigten jedoch mit 19% (AQP1 N76D/H180A/R195V) bzw. 14% (AQP1 N192D/H180A/R195V) der Wasserpermeabilität von AQP1-Wildtyp eine deutlich eingeschränkte Funktion als Wasserkanal (s. Abb. 4.19).

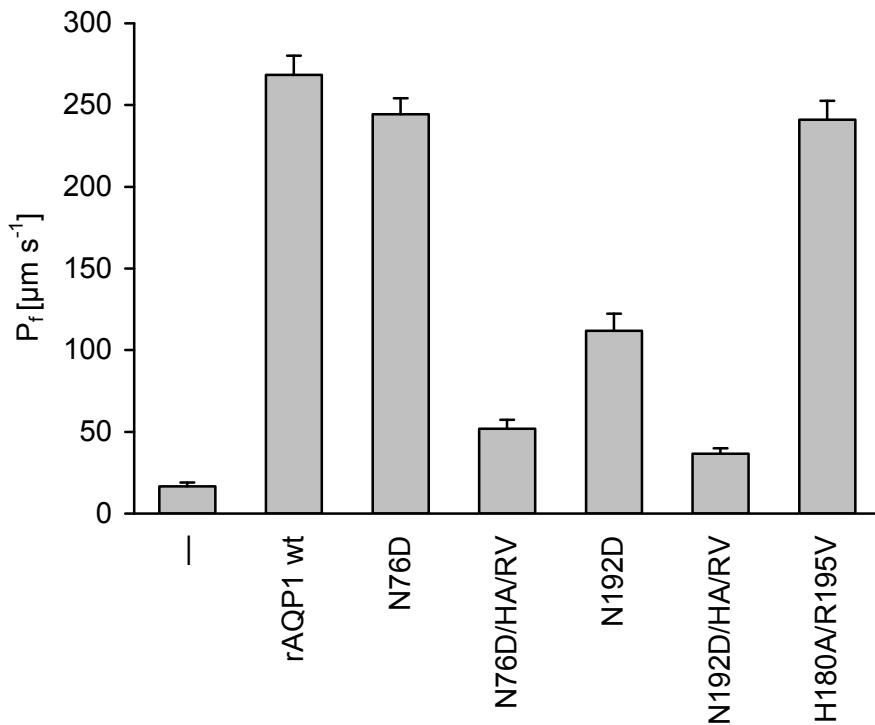


Abbildung 4.19: Osmotische Wasserpermeabilität. Die P_f -Werte wurden aus den Schwellraten nach 15 s berechnet (s. Abb. 4.18). Abgebildet sind Mittelwerte der P_f -Werte aus jeweils 20-25 Oozyten und die Standardfehler. Für den Vergleich von AQP1-Wildtyp und der Negativkontrolle mit AQP1 N192D sowie AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V ist $P < 0,01$.

pH-Abhängigkeit der Wasserpermeabilität der AQP1-Mutanten

Bei Verringerung des pH-Wertes kann sich der Protonierungszustand der Aspartatreste an Position 76 bzw. 192 ändern. Der pK_s -Wert beträgt für Aspartat etwa 3,9; er kann aber in Proteinen anders als in Lösungen stark variieren, da eine Beeinflussung durch Aminosäurereste in der Umgebung wahrscheinlich ist (Forsyth *et al.*, 2002). Aufgrund der reduzierten Wasserpermeabilität von AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V sollte die Hypothese überprüft werden, ob die Aspartatreste dieser Tripelmutanten bei physiologischem pH-Wert unprotoniert vorliegen und dadurch den Wasserfluss reduzieren. In den entsprechenden Einfachmutanten AQP1 N76D und AQP1 N192D könnte der Aspartatrest dagegen protoniert vorliegen und die Wasserpermeabilität nicht beeinflussen.

Um zu testen, ob sich die Wasserpermeabilität von AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V titrieren lässt, wurden die Oozyten-Schwelltests in ND96-Puffer bei unterschiedlichen pH-Werten erneut durchgeführt. Eine direkte

Schädigung der Oozyten bei pH 2 limitierte den Messbereich bei einem unteren pH-Wert von 2,5.

In Abbildung 4.20 ist zu erkennen, dass die Wasserpermeabilität der AQP1-Mutanten durch Senkung des pH-Wertes von 7 auf 2,5 nicht signifikant beeinflusst werden konnte ($P > 0,2$). Der Protonierungszustand der Aspartatreste lässt sich also nicht beeinflussen oder spielt für die Wasserpermeabilität keine Rolle.

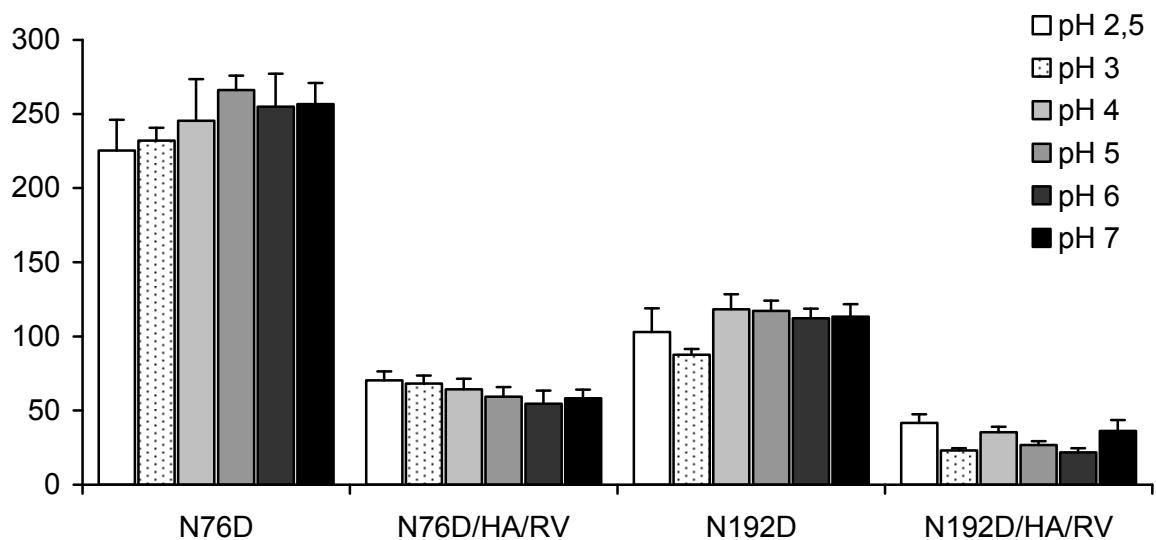


Abbildung 4.20: Osmotische Wasserpermeabilität in Abhängigkeit vom pH-Wert. Dargestellt sind die P_f -Werte aus 8-25 Oozyten mit Standardfehlern bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 2,5-7) für die Mutanten AQP1 N76D, AQP1 N192D, AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V.

4.3.3 Messung der Harnstoff- und Glycerolpermeabilität

Um die Integrität des Kanals nochmals zu überprüfen und den Durchmesser der Pore abschätzen zu können, wurden die Tripelmutanten AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V auf Permeabilität für die Solute Harnstoff und Glycerol getestet.

Dazu wurde über die Substitution von 65 mM NaCl durch 130 mM Harnstoff bzw. Glycerol im ND96-Puffer ein isotonischer zelleinwärts gerichteter Solutgradient von 130 mM erzeugt. Die Passage dieser Solute durch das Aquaporin führte zu einem Anstieg der Osmolarität im Inneren der Oozyte und damit sekundär zu einem Wassereinstrom. Da bei niedriger Wasserpermeabilität der sekundäre Wasser-

einstrom und damit der Soluteintritt beeinträchtigt sein kann, wurde cRNA von AQP1-Wildtyp koinjiziert (s. 3.4.3). Als Positivkontrolle dienten PfAQP exprimierende Oozyten, da es sich beim PfAQP aus *Plasmodium falciparum* um ein bifunktionelles Aquaglyceroporin mit hoher Permeabilität für Wasser sowie Harnstoff und Glycerol handelt (Hansen *et al.*, 2002; Newby *et al.*, 2008).

Harnstoffpermeabilität der AQP1-Mutanten

Aus der Oozyten-Schwellrate (s. Abb. 4.21) wurde die Harnstoffpermeabilität der Mutanten berechnet (s. 3.4.4). Durch den Schwelltest konnte gezeigt werden, dass AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V die Passage von Harnstoff erlauben. Im Vergleich zu AQP1 H180A/R195V war die Harnstoffpermeabilität der Tripelmutanten um 50% reduziert ($P < 0,01$). Der Durchtritt von Harnstoff durch AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V war ein zusätzlicher Hinweis auf eine korrekte Proteinfaltung.

In Abbildung 4.22 sind die P_s -Werte der getesteten Mutanten und Kontrollen aufgeführt. ND96-Puffer injizierte Oozyten dienten als Negativkontrolle.

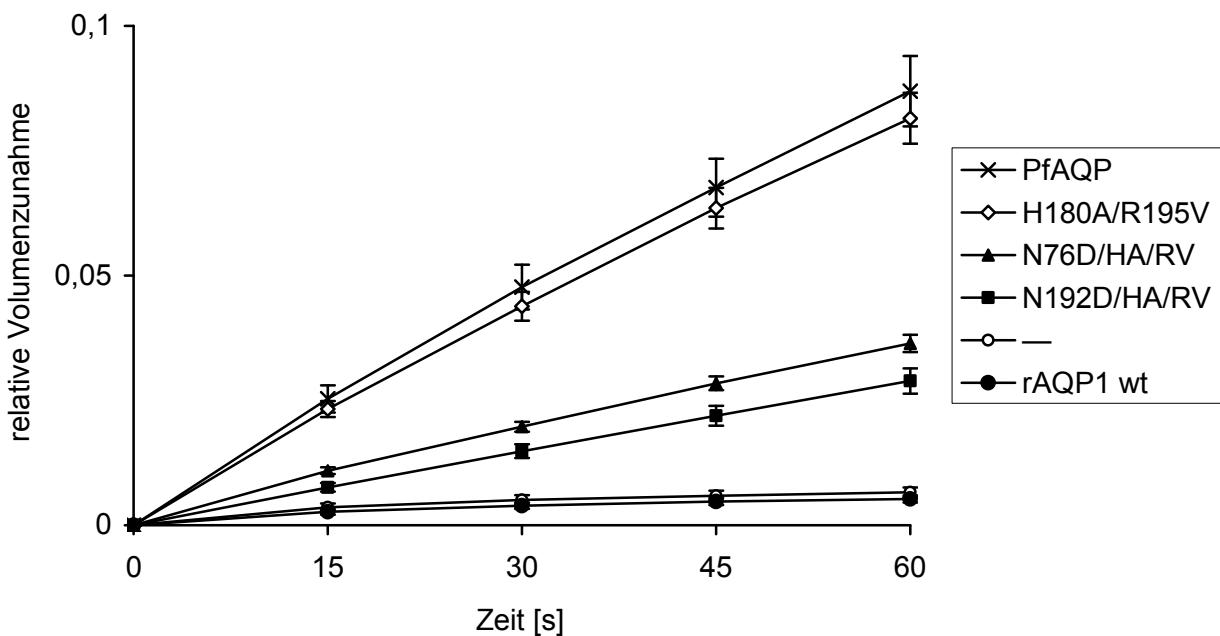


Abbildung 4.21: Oozyten-Schwelltest zur Bestimmung der isoosmolaren Harnstoffpermeabilität in ND96-Puffer mit Substitution von 65 mM NaCl durch 130 mM Harnstoff. Aufgetragen ist die relative Volumenänderung der Oozyten gegen die Zeit. Getestet wurden jeweils 15-20 Oozyten.

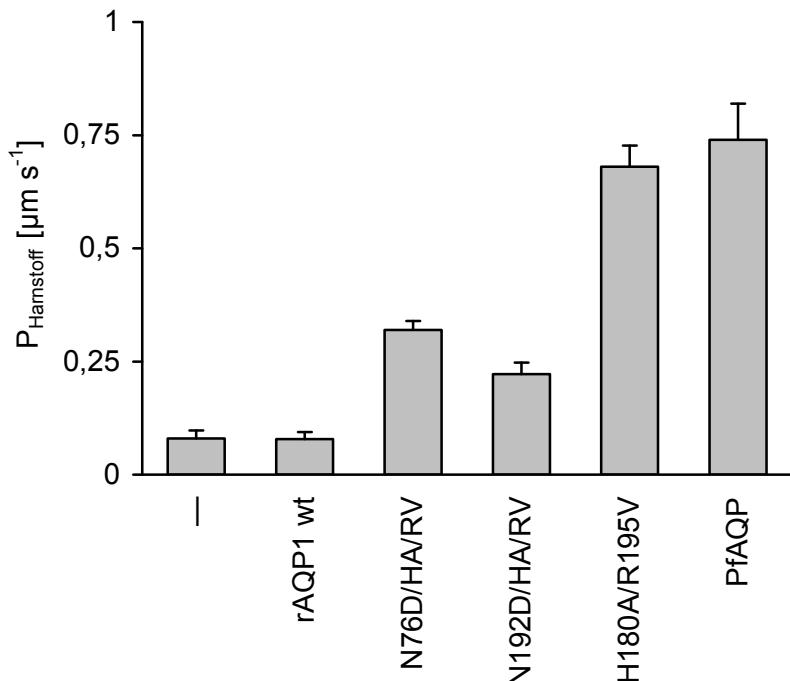


Abbildung 4.22: Isoosmolare Harnstoffpermeabilität. Die P_s -Werte wurden aus den Schwellraten nach 15 s berechnet (s. Abb. 4.21). Dargestellt sind P_s -Mittelwerte aus 15-20 getesteten Oozyten mit Standardfehlern. Getestet wurde in ND96-Puffer mit Substitution von 65 mM NaCl durch 130 mM Harnstoff.

Glycerolpermeabilität der AQP1-Mutanten

Um den Durchmesser der Pore in den Tripelmutanten einzuschränken, wurden diese auf Glycerolpermeabilität getestet. In ND96-Puffer mit 130 mM Glycerol anstelle von 65 mM NaCl zeigten die exprimierenden Oozyten keine signifikante Schwellung (s. Abb. 4.23).

Wie bereits für AQP1 H180A/R195V beschrieben (Beitz *et al.*, 2006), erlaubten also auch die Tripelmutanten keine Passage von Glycerol. Somit konnte gezeigt werden, dass der kleinste Poredurchmesser von AQP1 N76D/H180A/R195V und von AQP1 N192D/H180A/R195V wahrscheinlich weniger als 3,4 Å beträgt.

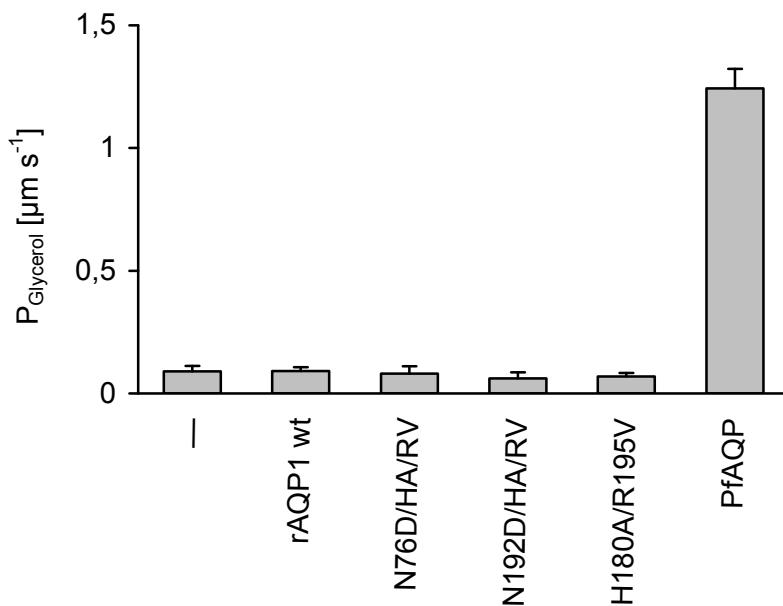


Abbildung 4.23: Oozyten-Schwelltest auf Glycerolpermeabilität. Abgebildet sind die aus den Schwellkurven nach 15 s errechneten P_s -Werte. Gemessen wurde in ND96-Puffer mit 130 mM Glycerol anstelle von 65 mM NaCl. Angegeben sind die P_s -Mittelwerte aus jeweils 10-20 Oozyten mit Standardfehlern.

4.3.4 Expressionskontrolle in *Xenopus laevis* Oozyten

Totalmembranpräparation

Für den Vergleich der Expressionsniveaus der AQP1-Mutanten mit AQP1-Wildtyp wurde die Totalmembranfraktion aus *Xenopus* Oozyten isoliert (s. 3.4.5). Auf dem SDS-Gel fanden sich annähernd gleiche Mengen an Gesamtprotein für alle AQP1-Mutanten (s. Abb. 4.24).

Der Western Blot der Membranfraktionen (s. Abb. 4.25) zeigte vergleichbare Expressionsstärken von AQP1-Wiltyp, den Mutanten AQP1 H180A/R195V, AQP1 N76D und AQP1 N192D/H180A/R195V. AQP1 N76D/H180A/R195V wurde deutlich stärker exprimiert. Für AQP1 N192D fand sich nur 60% der Expression verglichen mit AQP1-Wildtyp, was zum Teil die reduzierte Wasserpermeabilität erklären könnte (s. 4.3.2).

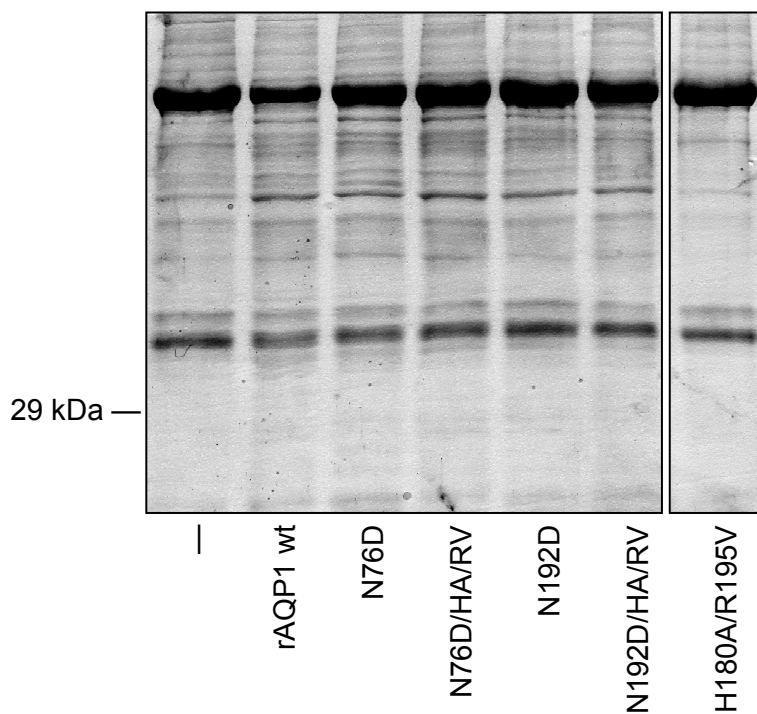


Abbildung 4.24: 10% SDS-Gel der Oozyten-Totalmembranfraktionen der Mutanten nach Coomassie-Färbung. Die Proteinmenge pro Spur entspricht einer Oozyte.

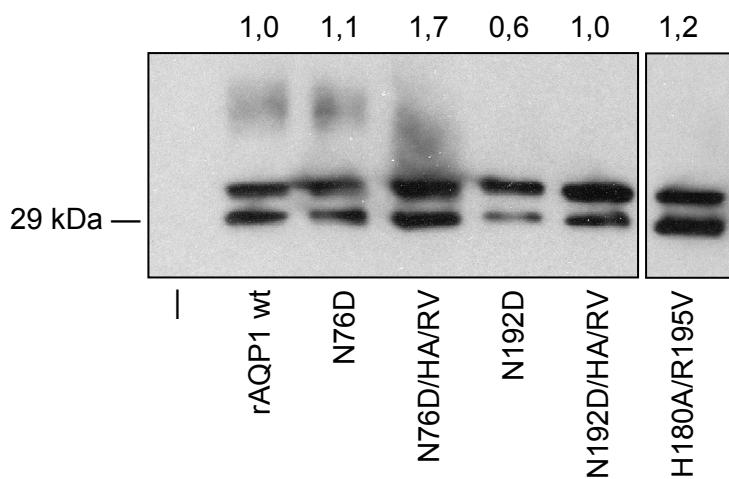


Abbildung 4.25: Western Blot der Oozyten-Totalmembranfraktion von AQP1-Wildtyp und -Mutanten. ND96-Puffer injizierte Oozyten dienten als Negativkontrolle. Pro Spur wurde die einer Oozyte entsprechende Proteinmenge aufgetragen. Der AQP1-Antikörper wurde 1:1000 in M-TBS-T eingesetzt. Es wurden nicht glykosylierte AQP1-Formen (untere Banden, 29 kDa) und glykosylierte Formen (obere Banden) detektiert. Die Zahlen über den Blots zeigen die Intensitäten im Verhältnis zu AQP1-Wildtyp an (Quantifizierung mit ImageJ).

Plasmamembranpräparation

Mit dem Totalmembranblot konnte gezeigt werden, dass die reduzierte Wasserpermeabilität von AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V nicht mit einer reduzierten Menge Totalmembranprotein korreliert. Für die differenzierte Be trachtung wurde nun die in der Plasmamembran vorliegende Proteinmenge bestimmt.

Für in *Xenopus* Oozyten exprimierte AQP2 war bereits bekannt, dass die Plasmamembran für Biotin-Analoga nicht dicht zu sein scheint, weswegen gleichzeitig intrazelluläres AQP2 detektiert wird (Kamsteeg und Deen, 2001). Aus diesem Grund konnte die weit verbreitete Biotinylierungsreaktion zur Quantifizierung von Plasmamembranproteinen nicht sicher eingesetzt werden. Als Alternativverfahren wurde eine mehrstufige Zentrifugation bei niedrigen Umdrehungszahlen nach Behandlung der Oozyten mit kolloidalem, kationischem Siliciumdioxid und Polyacrylsäure durchgeführt (s. 3.4.5) (Leduc-Nadeau *et al.*, 2007). Die Plasmamembranfraktion wurde jeweils isoliert und AQP1 N76D, AQP1 N76D/H180A/R195V sowie AQP1-Wildtyp darin quantifiziert.

Das Proteinmuster der Plasmamembranfraktionen (Abb. 4.26) unterschied sich deutlich von dem Muster der Totalmembranfraktionen (Abb. 4.24). Die aus 25 Oozyten isolierte Plasmamembranproteinmenge der untersuchten Proben war jeweils vergleichbar.

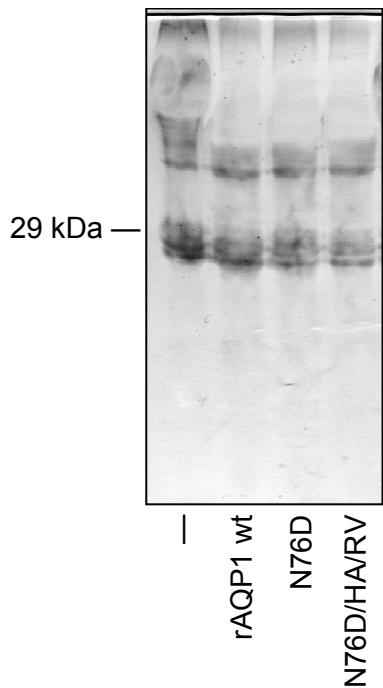


Abbildung 4.26: Protein-Trennungsmuster der *Xenopus Oozyten-Plasmamembranfraktion* auf einem 10% SDS-Gel nach Coomassiefärbung. Aufgetragen sind die Plasmamembranfraktionen von ND96-Puffer, AQP1-Wildtyp, AQP1 N76D und AQP1 N76D/H180A/R195V injizierten Oozyten. Pro Spur wurde eine 25 Oozyten entsprechende Proteinmenge aufgetragen.

Die Bestimmung der Aquaporinmenge darin erfolgte durch Western Blot (s. Abb. 4.27): Der Proteingehalt lag für AQP1 N76D und AQP1 N76D/H180A/R195V im Bereich von $\pm 20\%$ bezogen auf AQP1-Wildtyp. Die um ca. 80% geringere Wasserpermeabilität von AQP1 N76D/H180A/R195V im Vergleich zu AQP1 N76D konnte somit nicht auf eine verminderte Plasmamembranexpression zurückgeführt werden.

Das Verhältnis von glykosyliertem zu unglykosyliertem Protein zeigte Unterschiede und betrug für AQP1 N76D/H180A/R195V 1:1,9, im Gegensatz zu 1,6:1 für AQP1 N76D und 1,3:1 für AQP1-Wildtyp.

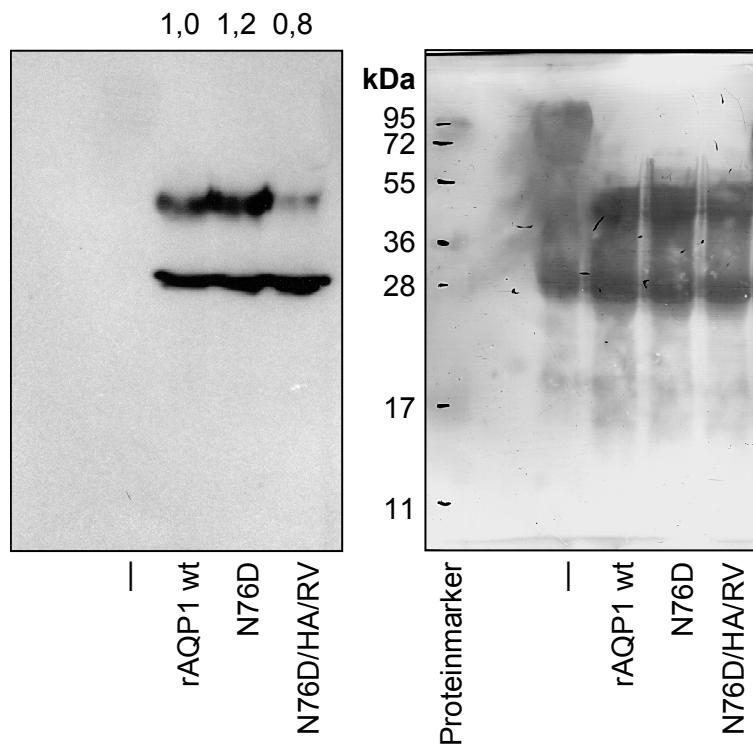


Abbildung 4.27: Links: Western Blot der Plasmamembranfraktionen von ND96-Puffer, AQP1-Wildtyp, AQP1 N76D und AQP1 N76D/H180A/R195V injizierten Oozyten. Pro Spur wurde die aus 25 Oozyten isolierte Plasmamembranfraktion aufgetragen. Der AQP1-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Die untere Bande zeigt unglykosyliertes, die obere Bande glykosyliertes Protein. Die Zahlen stellen die relativen Expressionsniveaus dar (Quantifizierung mit ImageJ). Rechts zeigt die mit Ponceau S gefärbte PVDF-Membran die Proteinmengen an.

Fusion mit pHluorin

Über den Plasmamembranblot hinaus wurde versucht, AQP1-Mutanten mit Hilfe einer Fusion mit pHluorin, einem pH-sensitiven GFP, in der Oozytenplasmamembran zu lokalisieren. Dazu wurden die pHluorin-AQP1-Konstrukte in den Oozytenvektor pOG1 (s. 2.4) kloniert und cRNA der Fusionskonstrukte synthetisiert (s. 3.4.2). Nach Injektion der cRNA und dreitägiger Inkubation wurden die Oozyten über Nacht in 3,7% Formaldehyd in PBS-Puffer bei 4°C konserviert. Durch konfokale Lasermikroskopie konnte dann eine Expression nachgewiesen werden (s. Abb. 4.28).

Alternativ zur Konservierung wurden mit den Oozyten Schwelltests durchgeführt: Die Wasserpermeabilität der Fusionskonstrukte entsprach der bereits gemessenen Permeabilität der Mutanten ohne pHluorin. Die pHluorin exprimierenden Oozyten führten

zu identischen Ergebnissen wie ND96-Puffer injizierte Kontolloozyten (Daten nicht gezeigt).

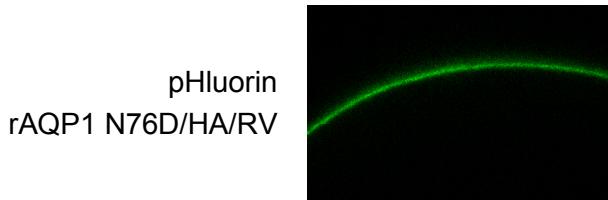


Abbildung 4.28: Konfokales Bild einer das Fusionsprotein pHluorin-AQP1 N76D/H180A/R195V exprimierenden Oozyte. Konservierung mit 3,7% Formaldehyd, Anregung bei 488 nm, Emission 500-550 nm, Objektiv 10x

4.4 Elektrophysiologische Untersuchung der AQP1-Mutanten

Die generierten AQP1-Mutanten im pOG1-Vektor (s. 3.9.2) wurden von unserem Kooperationspartner Prof. Zeuthen (Universität Kopenhagen) in *Xenopus* Oozyten exprimiert und elektrophysiologisch untersucht. Im Folgenden sind seine Messergebnisse aufgeführt.

Zur Bestimmung der Ionenpermeabilität wurde die Zwei-Elektroden-*voltage-clamp*-Messung angewandt. Bei dieser Technik wird ein konstantes Membranpotenzial angelegt und die Änderung im transmembranären Strom detektiert. In die *Xenopus laevis* Oozyte werden dazu zwei Mikroelektroden eingebracht. Die Spannungselektrode misst das aktuelle Membranpotenzial, welches über einen Verstärker mit dem eingestellten Haltepottenzial verglichen wird. Aus der Differenz der Signale ergibt sich die Stromstärke, die für das Erreichen des Haltepottenzials nötig ist. Der Strom wird über die Stromelektrode appliziert und über eine Badeelektrode gemessen (Zeuthen *et al.*, 1997). Alle *voltage-clamp*-Messungen wurden mit demselben Pulsprotokoll durchgeführt. Dabei wurde die Oozyte ausgehend von einem Haltepottenzial (-50 mV) sequentiell in 20 mV-Schritten auf Membranpotenziale zwischen -140 mV und +40 mV eingestellt (s. Abb. 4.29 rechts) (Sogaard *et al.*, 2009). In dieser Abbildung sind ebenfalls die gemessenen *steady state*-Ströme für AQP1 N76D/H180A/R195V bei den geklemmten Potenzialen, gemessen in 100 mM Cholinchlorid als Kontrolllösung und in 100 mM NaCl, dargestellt.

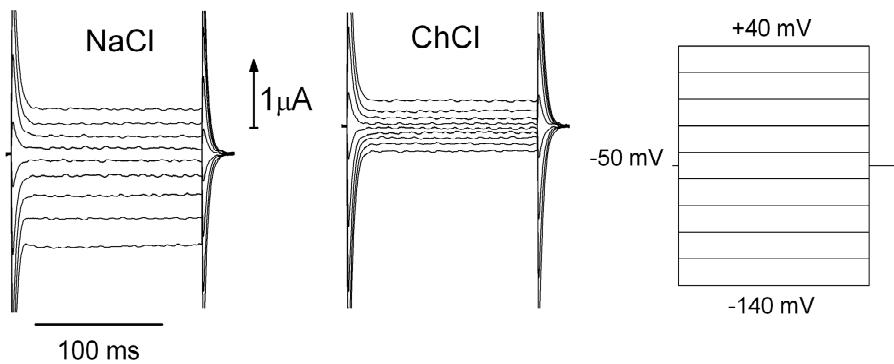


Abbildung 4.29: Gezeigt ist rechts das bei den voltage-clamp-Messungen angewandte Standardpulsprotokoll ausgehend von einem Membranpotenzial von -50 mV. Links sind die resultierenden steady state-Ströme am Beispiel von AQP1 N76D/H180A/R195V nach 100 ms in einer Badlösung mit 100 mM NaCl (links) bzw. in 100 mM Cholinchlorid (Mitte) dargestellt.

Wasser injizierte Kontrolloozyten zeigten eine Permeabilität von ca. $9 \cdot 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$ für Protonen, von $(0,1 \pm 0,84) \cdot 10^{-9} \text{ cm s}^{-1}$ für Natrium- und von $(3,6 \pm 2,0) \cdot 10^{-9} \text{ cm s}^{-1}$ für Kaliumionen. Da diese Werte nicht signifikant von der AQP1-Wildtyp-Permeabilität abwichen, wurden letztere für den Vergleich mit den Mutanten herangezogen. In Abbildung 4.30 repräsentieren die AQP1-Wildtyp-Daten die Leckströme; die Werte der Mutanten wurden nicht korrigiert. Die Permeabilität wurde mit Hilfe der folgenden Näherung der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung für stark negative Potenziale aus den Stromstärken berechnet, die für das Halten des Potenzials bei -120 mV nötig waren:

$$P = \frac{I_C \cdot R \cdot T}{V \cdot F^2 \cdot C}$$

Dabei ist I_C der gemessene Strom bei der geklemmten Spannung V (hier 120 mV) und bei der absoluten Temperatur T , C ist die Konzentration der untersuchten Ionen, R die allgemeine Gaskonstante und F die Faraday-Konstante.

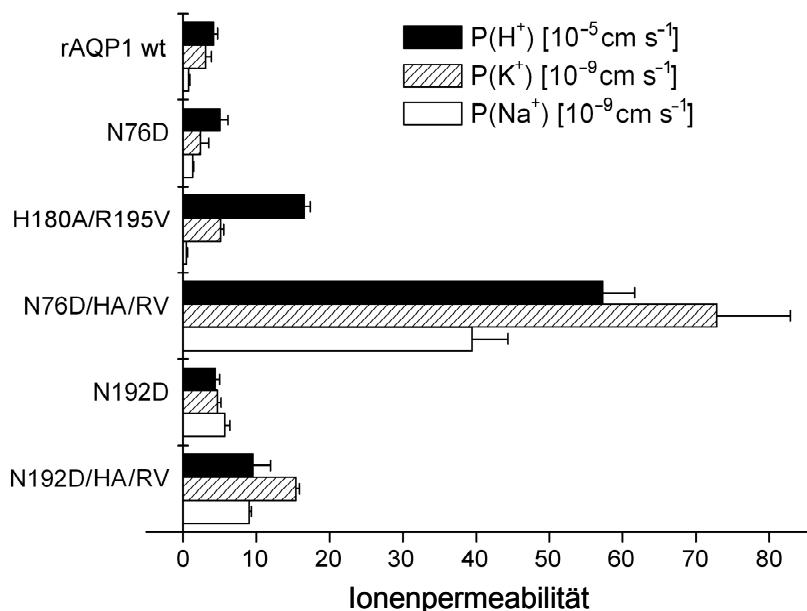


Abbildung 4.30: Ionenpermeabilität für Protonen, Natriumionen und Kaliumionen von AQP1-Wildtyp und -Mutanten exprimierenden Oozyten. Die Permeabilität wurde aus den Strömen bei einem Haltepotenzial von -120 mV berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte aus Messungen von 5-14 Oozyten und die entsprechenden Standardfehler. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der Protonenpermeabilität.

Bei der elektrophysiologischen Messung von AQP1 N76D und AQP1 N192D konnte keine Protonenpermeabilität nachgewiesen werden (s. Abb. 4.30). Die niedrige Protonenpermeabilität von AQP1 H180A/R195V mit $P(H^+) = 1,7 \cdot 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ wurde jedoch bestätigt (Beitz *et al.*, 2006).

Bei der Testung auf Natrium- und Kaliumionenpermeabilität konnte für AQP1 N192D ein Natriumionenleck bei stark negativen Potenzialen gemessen werden mit $P(Na^+) = 6 \cdot 10^{-9} \text{ cm s}^{-1}$.

Die Tripelmutante AQP1 N76D/H180A/R195V weist mit $P(H^+) = 5,8 \cdot 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ eine fast viermal so hohe Protonenpermeabilität wie AQP1 H180A/R195V auf.

Auch die Permeabilität für Kalium- und Natriumionen wurde gemessen ($P(K^+) = 7,2 \cdot 10^{-8} \text{ cm s}^{-1}$, $P(Na^+) = 4 \cdot 10^{-8} \text{ cm s}^{-1}$), die Werte waren allerdings um den Faktor 10^4 kleiner im Vergleich zu Protonen.

Abbildung 4.31 zeigt die Strom-Spannungskurve von AQP1 N76D/H180A/R195V in 100 mM Cholinchlorid bei unterschiedlichen pH-Werten der Badlösung sowie bei Substitution der entsprechenden molaren Menge Cholinchlorid durch 25 mM KCl oder 50 bzw. 100 mM NaCl bei pH 7,4.

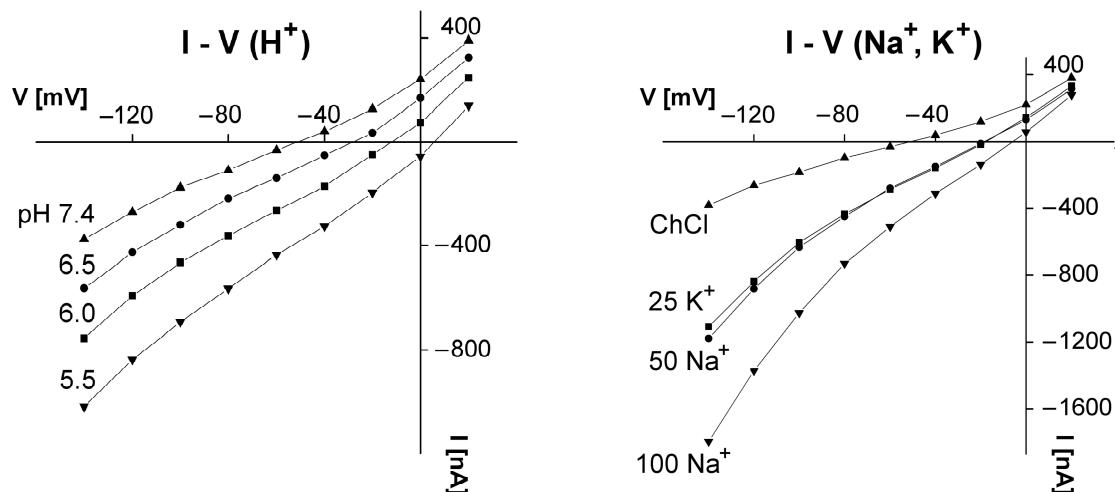


Abbildung 4.31: Strom-Spannungskurven für AQP1 N76D/H180A/R195V. Links: in 100 mM Cholinchlorid bei pH 7,4/6,5/6,0/5,5. Rechts: in 25 mM KCl + 75 mM Cholinchlorid, 50 mM NaCl + 50 mM Cholinchlorid sowie 100 mM NaCl im Vergleich zur Kontrolllösung mit 100 mM Cholinchlorid bei pH 7,4

Die für Kationen permeable Mutante AQP1 N76D/H180A/R195V wurde zusätzlich auf Permeabilität für Lithium-, Cäsium- und Rubidiumionen getestet, so dass folgende Sequenz bestimmt werden konnte:

$$P(K^+): P(Rb^+): P(Na^+): P(Cs^+): P(Li^+) = 1: 0,81: 0,59: 0,5: 0,32.$$

AQP1 N192D/H180A/R195V zeigte ebenfalls Permeabilität für Kationen, allerdings fielen die Werte im Vergleich zu AQP1 N76D/H180A/R195V deutlich kleiner aus. Die Permeabilität von AQP1 N192D/H180A/R195V für Protonen betrug mit $P(H^+) = 9,6 \cdot 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$ ein Sechstel, für Natrium- ($P(Na^+) = 9 \cdot 10^{-9} \text{ cm s}^{-1}$) und Kaliumionen ($P(K^+) = 1,5 \cdot 10^{-8} \text{ cm s}^{-1}$) ein Fünftel. Verglichen mit AQP1 N192D war die Natriumionenpassage doppelt so hoch.

AQP1 N76A und AQP1 N192A konnten in *Xenopus* Oozyten nicht exprimiert werden. Dieses Ergebnis korreliert mit den Expressionsdaten von Mutanten mit Asparagin-nach-Alanin-Austausch aus *Saccharomyces cerevisiae*, da dort AQP1 N76A und AQP1 N76A/H180A/R195V ebenfalls keine Expression zeigten. Lediglich eine schwache Expression der AQP1 N76A/R195V-Mutante war zu erkennen, jedoch keine funktionelle Aktivität. Dies deutet auf eine inkorrekte Proteinfaltung dieser Mutanten hin (s. 4.2.1, Abb. 4.3 und 4.3.2, Abb. 4.7).

Auch AQP1 N76D/N192D/H180A/R195V konnte in *Xenopus* Oozyten nicht exprimiert werden.

Die Testung von AQP1 N76S und AQP1 N76S/H180A/R195V zeigte keine Kationenpermeabilität bei um 20% reduzierter Wasserpermeabilität verglichen mit AQP1-Wildtyp (Daten nicht gezeigt).

4.5 *In vivo pH-Messung durch Fusion der AQP1-Mutanten mit ratiometrischem pHluorin*

Für eine *in vivo* Messung der Protonenpermeabilität wurde ratiometrisches pHluorin an den N-Terminus von AQP1-Wildtyp und -Mutanten gekoppelt. Das pHluorin besitzt zwei pH-abhängige Anregungsmaxima (s. 3.7) und sollte als lokaler pH-Sensor agieren. Dabei würde das Aquaporin *trafficking* zur Membran vermitteln und das pHluorin am N-Terminus des Aquaporins intrazellulär lokalisiert sein. Eventueller Protoneneinstrom durch Aquaporinmutanten würde das Fluoreszenzemissionsverhältnis F390/F475 im Vergleich zu AQP1-Wildtyp verändern. In Kooperation mit PD Dr. Plieth (Universität Kiel) wurde in einer Durchflusszelle unter Perfusion von Pufferlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten das Fluoreszenzemissionsverhältnis in verschiedenen Expressionssystemen bestimmt.

Zusätzlich sollte durch konfokale Lasermikroskopie die korrekte Lokalisation dieser Fusionsproteine in der Plasmamembran direkt gezeigt werden.

4.5.1 Expression der pHluorin-Konstrukte in *Saccharomyces cerevisiae*

Als Testsystem wurde zunächst *Saccharomyces cerevisiae* als naheliegend und sicher exprimierend gewählt. Es wurde eine Transformation der Hefe mit den Fusionskonstrukten und pHluorin als Kontrolle im Vektor pRS426MET durchgeführt (s. 3.1.18 und 3.9.3). Die Betrachtung der die Fusionsproteine exprimierenden Hefezellen unter dem Binokular zeigte sehr heterogene Fluoreszenz (s. Abb. 4.32). Nur wenige Zellen fluoreszierten, einige der frisch transformierten Kolonien leuchteten gar nicht. Zudem wurde eine starke Eigenfluoreszenz der Hefezellen beobachtet.

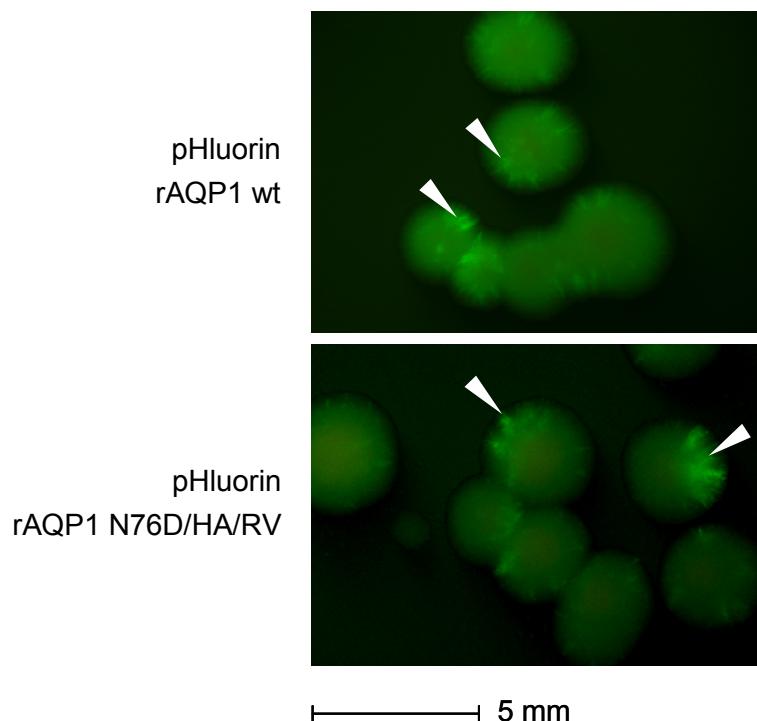


Abbildung 4.32: *Saccharomyces cerevisiae*-Kolonien des Stammes BY4742 Δ fps1 mit pHluorin-AQP1-Wildtyp und pHluorin-AQP1 N76D/H180A/R195V auf SD-Agar unter dem Fluoreszenz-Binokular. Die Pfeile deuten auf pHluorin-Fusionsproteine in den exprimierenden Zellen. Deutlich zu sehen ist die Hintergrundfluoreszenz der Hefezellen.

Die Expression und Lokalisation der Fusionsproteine wurde durch konfokale Lasermikroskopie überprüft (s. Abb. 4.33). Als Kontrolle sind Hefezellen gezeigt, die lösliches pHluorin im Zytosol exprimieren. Anhand der konfokalen Bilder von Hefezellen mit den Fusionsproteinen pHluorin-AQP1-Wildtyp bzw. pHluorin-AQP1 N76D/H180A/R195V ist eine Translokation zur Plasmamembran erkennbar. Die Fusionsproteine schienen somit funktionell zu sein, da das *trafficking* zur Plasmamembran und der Einbau des Aquaporins in die Plasmamembran statt fand. Damit war zu erwarten, dass das pHluorin am N-Terminus des Aquaporins intrazellulär lokalisiert war. Neben der Expression in der Plasmamembran ist auch eine Expression in intrazellulären Membranen zu sehen.

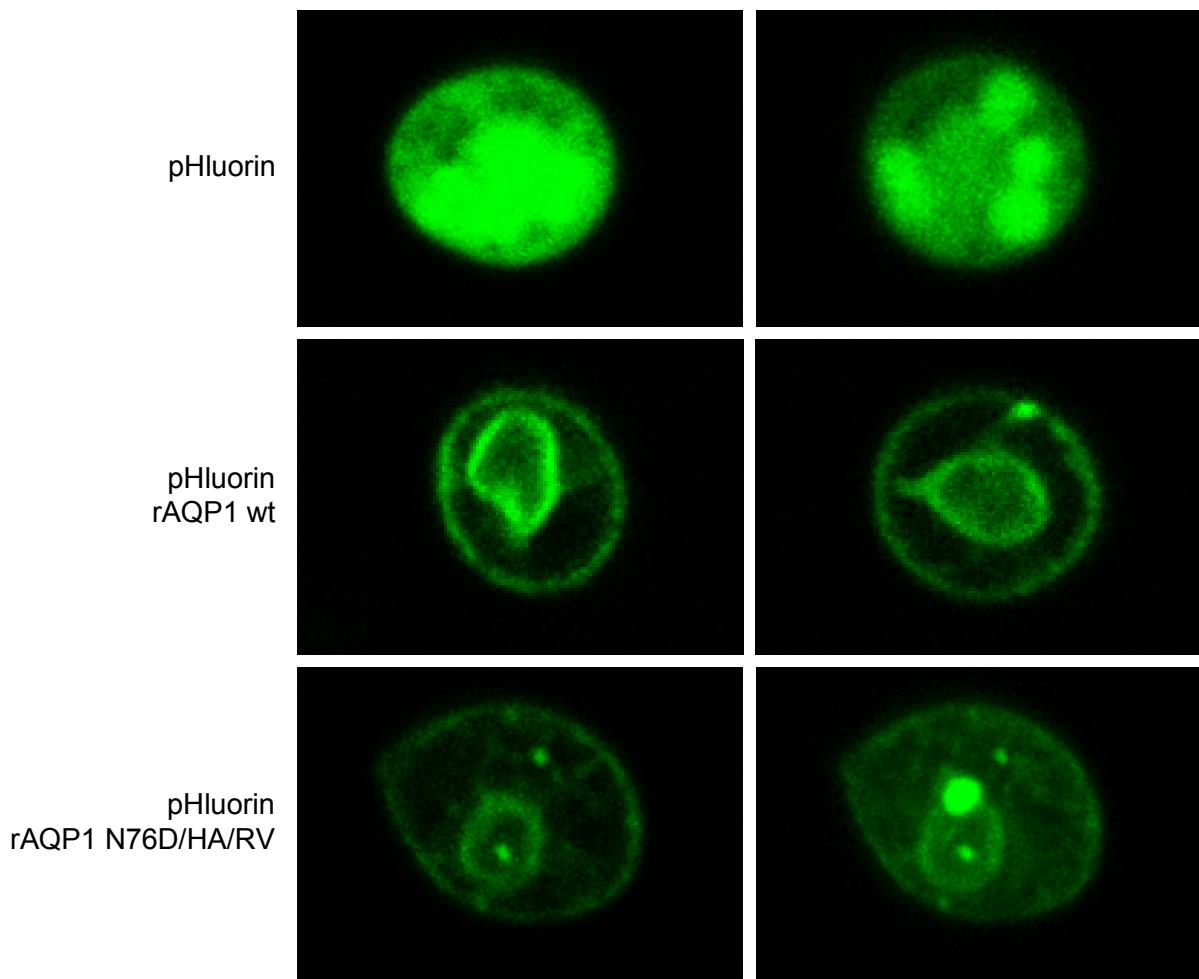


Abbildung 4.33: Konfokale lasermikroskopische Aufnahmen von *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen des Stammes 31019 Δ fps1 mit pHluorin bzw. pHluorin-AQP1-Fusionsproteinen. Es sind jeweils zwei Beispiele gezeigt. Die Hefezellen wurden zur Fixierung in 1% Agarose eingebettet. Die Anregungswellenlänge betrug 488 nm, die Emission wurde bei 500-550 nm detektiert, Objektiv 63x.

Nach der Überprüfung der Lokalisation innerhalb der Hefezellen wurden Anregungsspektren der Fusionskonstrukte *in vivo* in der Perfusionskammer unter dem Fluoreszenzmikroskop aufgezeichnet. Die Abbildung 4.34 zeigt das Spektrum des untransformierten Hefestammes BY4742 Δ fps1, der erschwerend eine starke Eigenfluoreszenz aufweist, sowie das Anregungsspektrum von Hefezellen des gleichen Stammes, die das Fusionsprotein pHluorin-AQP1-Wildtyp exprimieren. Nur schwach sind die für GFP typischen Anregungsmaxima bei 395 nm und 475 nm erkennbar. Durch Subtraktion der Autofluoreszenz ergibt sich ein Differenzspektrum mit deutlich erkennbaren Anregungsmaxima.

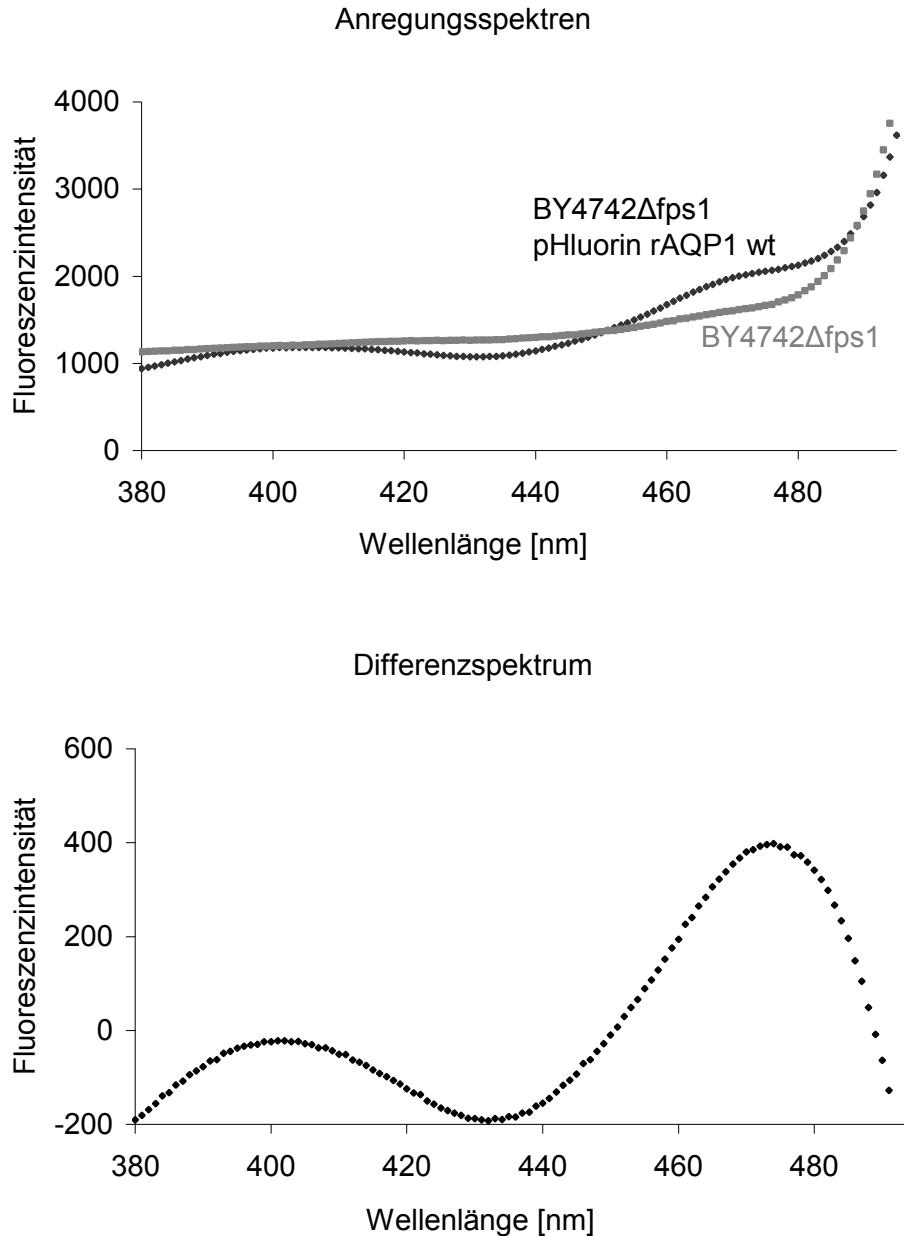


Abbildung 4.34: Oben abgebildet sind die *in vivo* Anregungsspektren von Hefezellen mit pHluorin-AQP1-Wildtyp und von untransformierten Hefezellen als Kontrolle im Stamm BY4742 Δ fps1. Die untere Abbildung zeigt das Differenzspektrum, welches einen GFP-typischen Verlauf aufweist.

Um die hohe intrinsische Fluoreszenz des Hefestamms BY4742 Δ fps1 als Störgröße zu vermeiden, wurden weitere Hefestämme getestet, da einzelne *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme in dieser Eigenschaft bekanntermaßen stark variieren (Knight et al., 2002; Bhatta und Goldys, 2008). Ausgewählt wurde der im Labor vorhandene Stamm mit der niedrigsten Autofluoreszenz: 31019 Δ fps1. Dieser wurde für die weiteren Experimente verwendet. Beim Perfusionsversuch wurden die Hefezellen,

die von der SD-Agarplatte (pH 6,8) in die Durchflusszelle überführt wurden, zunächst in MES gepufferter 20% Glucoselösung bei pH 6,8 äquilibriert. Die Bestimmung des Fluoreszenzemissionsverhältnisses erfolgte bei pH-Werten von 3 und 6,8. Wie in Abbildung 4.35 zu erkennen, reagierten alle Hefezellen, auch pHluorin-Transformanden, deutlich auf den pH-Shift von 6,8 nach 3. Das Emissionsverhältnis fiel um etwa 0,1 Einheiten. Das bedeutete, dass Protonen in die Hefezellen gelangten und den zytosolischen pH-Wert senkten. Nach der erneuten Umstellung auf Perfusion mit Puffer mit pH 6,8 wurde das Fluoreszenzemissionsverhältnis vom Anfang wieder erreicht.

Bei gegebener Protonenpermeabilität von AQP1 N76D/H180A/R195V wäre bei den entsprechenden Transformanden ein veränderter intrazellulärer pH-Verlauf im Vergleich zu den Kontrollen zu erwarten: Durch in der Hefemembran exprimierte Protonen leitende Aquaporine sollte der pH-Wert-Abfall im Zytosol und damit die Fluoreszenzänderung des pHluorins bei einem *pH-shift* schneller erfolgen. Wie in Abbildung 4.35 zu erkennen, führt AQP1 N76D/H180A/R195V nicht zu einem steileren Abfall bzw. Anstieg des intrazellulären pH, unterscheidet sich also nicht von den Kontrollen.

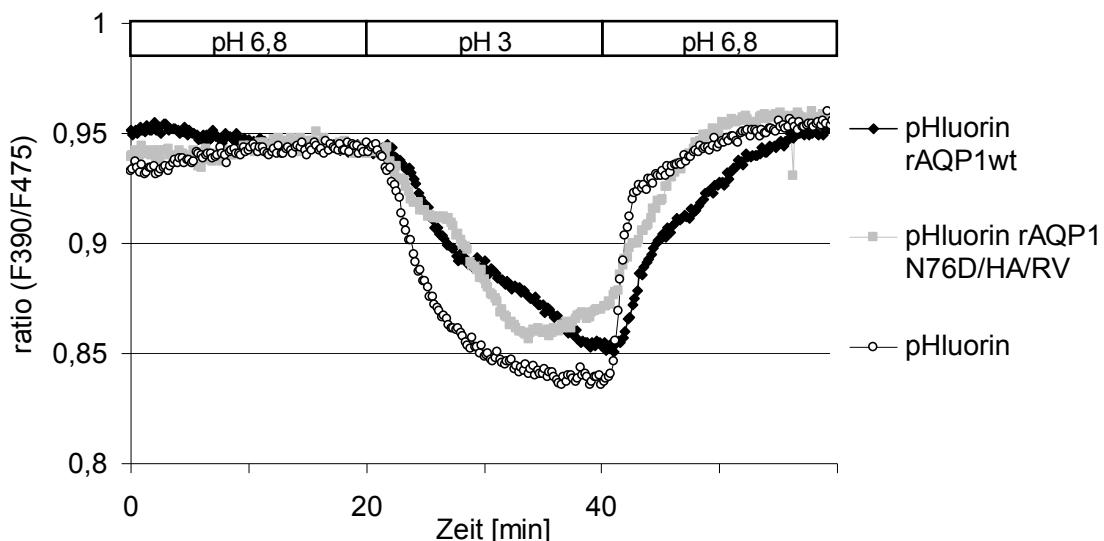


Abbildung 4.35: Perfusionsversuche mit Hefezellen des Stammes 31019Δfps1, die entweder pHluorin oder Fusionsprodukte von pHluorin mit AQP1-Wildtyp bzw. mit AQP1 N76D/H180A/R195V exprimieren. Dargestellt sind Durchschnittskurven aus jeweils drei individuellen Experimenten. Die Werte für das Fluoreszenzemissionsverhältnis wurden bei 20 min auf ein Niveau normiert.

4.5.2 Expression der pHluorin-Konstrukte in *Allium porrum*

In Kooperation mit PD Dr. Plieth wurde als weitere Variante eine Expression der Fusionsproteine in *Allium porrum*-Epidermiszellen versucht. Im Gegensatz zu Hefezellen könnte bei diesen aufgrund der Größe die Vitalität vor und nach den Perfusionsexperimenten eindeutig beurteilt werden. Vor allem bestand die Hoffnung auf eine weniger starke Reaktion der Kontrollzellen auf pH-Unterschiede im Puffer.

Zur Kontrolle der Lokalisation der Fusionsproteine wurden mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie biolistisch transformierte Porree-Epidermiszellen untersucht, die Fusionsproteine sowie pHluorin als Kontrolle exprimierten (s. 3.6). Wie in Abbildung 4.36 deutlich wird, kann über die Lokalisation keine eindeutige Aussage gemacht werden, da aufgrund der Größe der Vakuole in Epidermiszellen aus *Allium porrum* eine Unterscheidung zwischen Plasmamembranexpression und Lokalisation im wandständigen Zytosplasma schwierig ist.

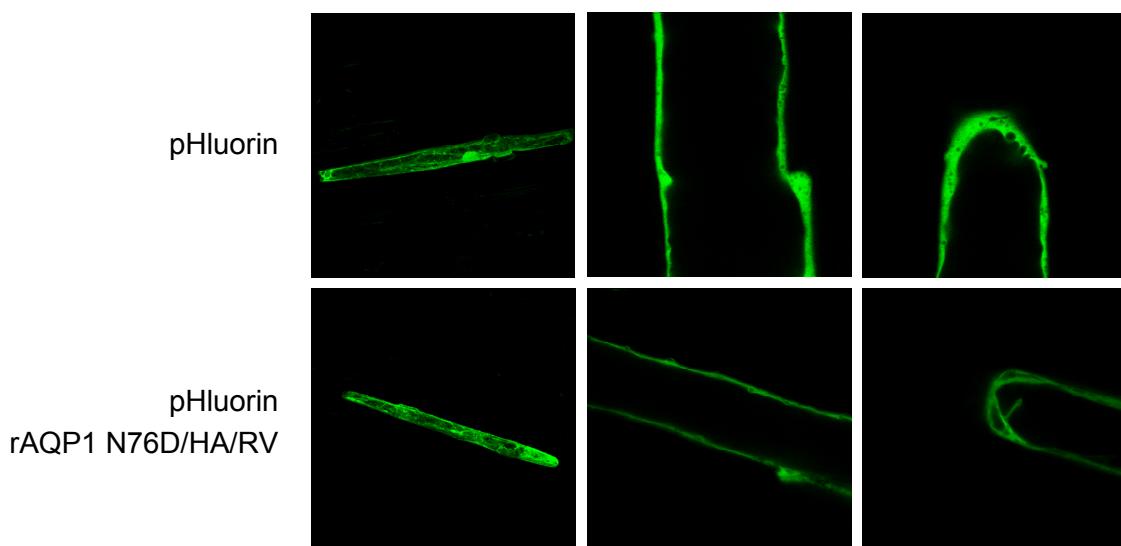


Abbildung 4.36: Konfokalmikroskopische Bilder von *Allium porrum*-Epidermiszellen 24 h nach biolistischer Transformation. Oben dargestellt sind Zellen, die pHluorin exprimieren, unten Zellen, die Fusionsproteine aus pHluorin und rAQP1 N76D/H180A/R195V exprimieren (Objektiv 20/40x, Anregung 488 nm, Emission 500-550 nm).

Mit den transient transformierten Porree-Epidermiszellen wurden ebenfalls *in vivo* Anregungsspektren aufgezeichnet. Sowohl die Fusionsproteine pHluorin-AQP1-Wildtyp und pHluorin-AQP1 N76D/H180A/R195V als auch pHluorin als Kontrolle zeigten GFP-typische Spektren (Daten nicht gezeigt). Die Autofluoreszenz war geringer als im Hefesystem. In den Perfusionsexperimenten mit Porreezellen zeigte sich

wie bei den Hefezellen leider ebenfalls eine recht starke intrinsische pH-Abhängigkeit (s. Abb. 4.37). Im Rahmen der Vorversuche fand sich auch hier kein deutlicher Unterschied in der Permeabilität, weswegen dieses Testsystem nicht weiterentwickelt wurde.

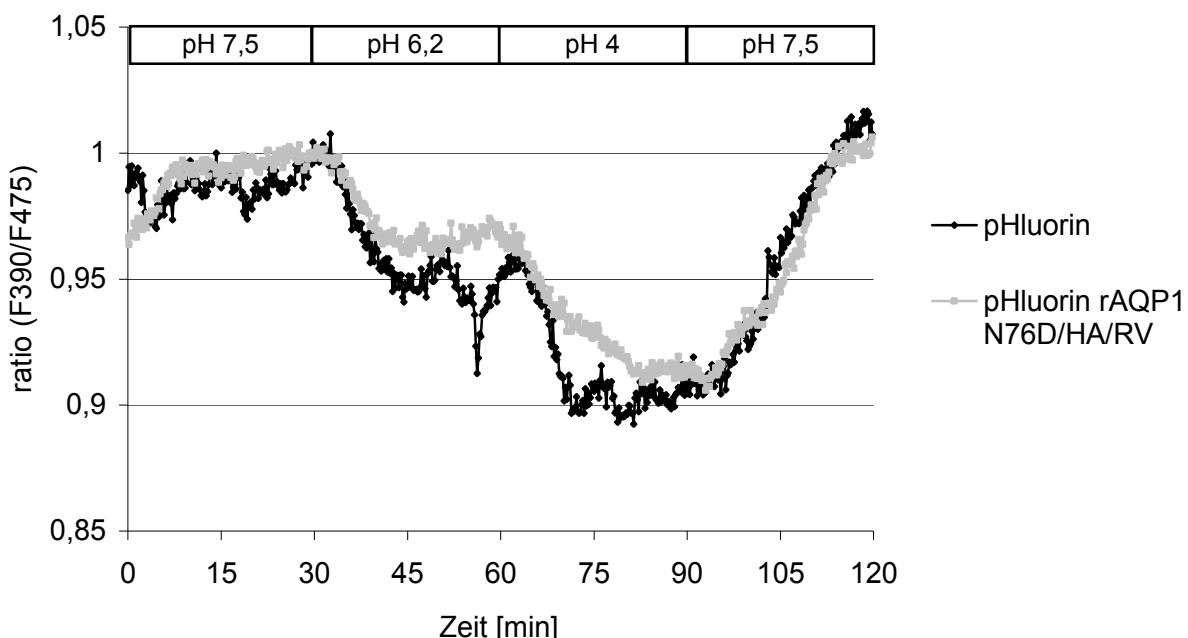


Abbildung 4.37: Perfusionsversuche mit *Allium porrum*-Epidermiszellen. Dargestellt sind Fluoreszenzemissionsverhältnisse F390/F475 von pHluorin exprimierenden und pHluorin-AQP1 N76D/H180A/R195V exprimierenden Zellen über 2 h mit den im Balken dargestellten pH-Shifts.

4.5.3 Expression der pHluorin-Konstrukte in HEK-293-Zellen

Als drittes Testsystem wurde eine Expression der pHluorin-Fusionsproteine in HEK-293-Zellen versucht. In dieser menschlichen Nierenzelllinie konnte eine Expression von AQP1-GFP-Fusionsproteinen bereits nachgewiesen werden (Hoque *et al.*, 2000). Neben dem *trafficking* zur Plasmamembran wurde eine hohe Expression erwartet.

Es wurden das pHluorin sowie die Fusionskonstrukte pHluorin-AQP1-Wildtyp und pHluorin-AQP1 N76D/H180A/R195V im Vektor pIRES1neo in die Zellen eingeschleust (s. 3.5.5). Nach 24-30 h wurde die Transfektionseffizienz fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Es fand sich eine Rate von ca. 10% transient transfizierten HEK-293-Zellen. Die Fluoreszenzintensität der Fusionsproteine schien jedoch sehr

4. Ergebnisse

schwach zu sein, bei zusätzlich relativ hoher Eigenfluoreszenz der Zellen. Für die genauere Untersuchung der Lokalisation der Proteine wurden die HEK-293-Zellen 30 h nach der Transfektion unter dem konfokalen Lasermikroskop betrachtet. Dabei erschienen die transfizierten Zellen weniger vital sowie morphologisch verändert. Bei insgesamt schwacher Fluoreszenzintensität war eine homogene zytosolische Expression des pHluorins sichtbar (s. Abb. 4.38). In den Fusionsprotein exprimierenden Zellen deuteten reichlich vorhandene intrazelluläre, granulöse, fluoreszierende Einschlüsse auf einen Verbleib der Fusionsproteine im endoplasmatischen Retikulum hin. Dagegen war die Fluoreszenz in der Plasmamembran sehr schwach und undeutlich.

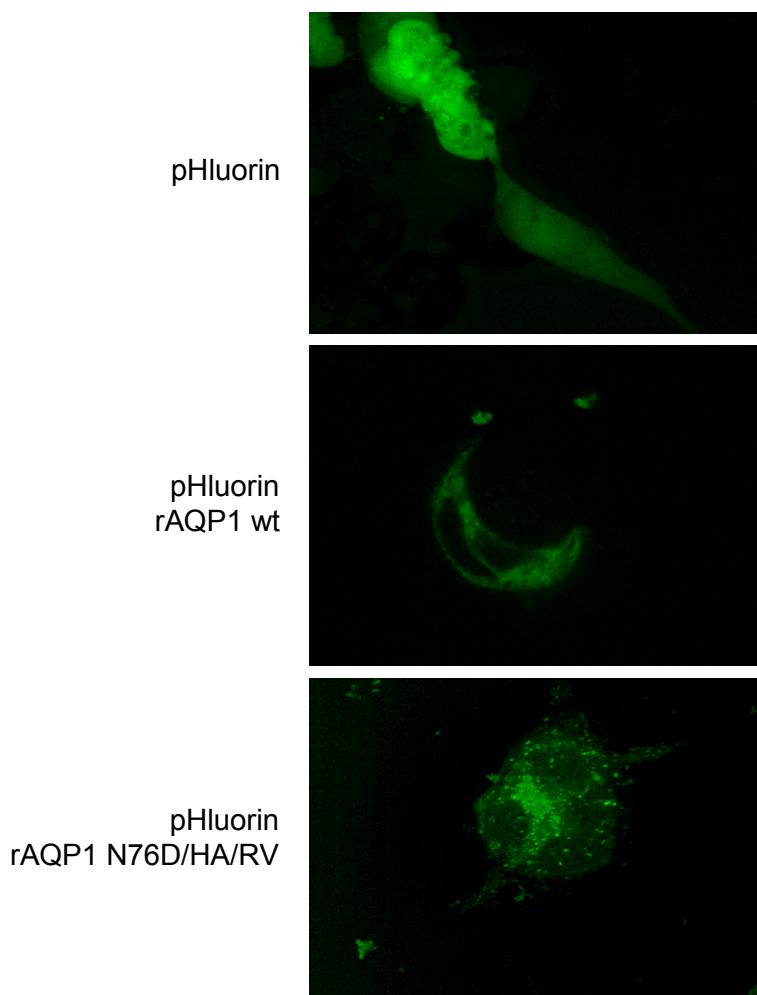


Abbildung 4.38: Aufnahmen von HEK-293-Zellen (konfokale Lasermikroskopie) mit pHluorin und pHluorin-Fusionen mit AQP1-Wildtyp bzw. AQP1 N76D/H180A/R195V 30 h nach der Transfektion. Die HEK-293-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen gezüchtet.

Wegen der unsicheren Membranexpression bei gleichzeitiger morphologischer Veränderung der HEK-293-Zellen mit intrazellulären Einschlüssen schied auch dieses Zellsystem für weitere Perfusionsversuche zur intrazellulären pH-Messung aus.

4.6 Vorbereitung der Proteinreinigung von AQP1 N76D/H180A/R195V

Um AQP1 N76D/H180A/R195V noch exakter beschreiben zu können, ist eine Rekonstitution in Liposomen mit biophysikalischer Untersuchung in einer planaren künstlichen *bilayer*-Membran bei Prof. Pohl (Universität Linz) geplant. Für diese Testung wurde das Protein in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert. Nach Klonierung eines 10xHis-tags in den durch Galaktose induzierbaren Vektor pYES260 wurde die für rAQP1 N76D/H180A/R195V (aus der Ratte) kodierende DNA am 5'-Ende an den *tag* ligiert, so dass ein *linker* zwischen *tag* und Aquaporin entstand (s. 3.9.4). Parallel wurden die drei Mutationen in das Konstrukt pYES2 10xHis hAQP1 (aus dem Menschen) eingeführt (s. 3.9.4).

Für die Expression wurden die laboreigenen Hefestämme verwendet. Zunächst wurde für das entstandene Konstrukt pYES2 10xHis rAQP1 N76D/ H180A/R195V, welches zwei Startcodons enthält, gezeigt, dass vorwiegend das His-getaggte Protein exprimiert wird (s. Abb. 4.39).

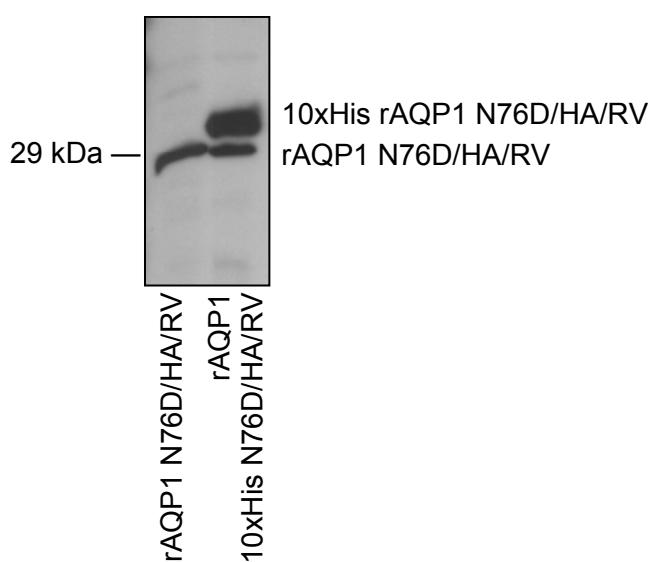


Abbildung 4.39: Western Blot der Konstrukte rAQP1 N76D/H180A/R195V und 10xHis rAQP1 N76D/H180A/R195V im Hefestamm BY4742. Detektiert wurde mit AQP1-Antiserum in einer 1:1000 Verdünnung.

4. Ergebnisse

Getestet wurden die Hefestämme BY4742 sowie 31019Δfps1. Aus 200 ml-Ansätzen wurde nach 16 h Induktion die Totalmembranfraktion isoliert und im Western Blot analysiert. Dabei zeigte sich eine etwas stärkere Expression für 10xHis rAQP1 N76D/H180A/R195V und 10xHis hAQP1 N76D/H180A/R195V im Stamm BY4742.

Die Proteinexpression und -reinigung von 10xHis rAQP1 N76D/H180A/R195V wurde dann nach dem in Abschnitt 3.8 beschriebenen Protokoll versucht. Die Ausbeute fiel sehr gering aus mit < 50 µg Protein in einem Volumen von 200 µl nach Aufkonzentrierung der Eluatfraktionen mittels Zentrifugation in einer Amicon-Filtereinheit mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa. In Abbildung 4.40 ist der Western Blot einiger Fraktionen dargestellt.

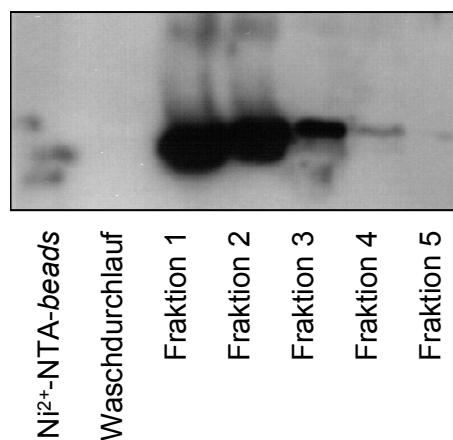


Abbildung 4.40: Western Blot einzelner Fraktionen der Proteinreinigung von 10xHis rAQP1 N76D/H180A/R195V bei der Elution mit Imidazol. Detektiert wurde mit AQP1-Antikörper 1:1000 in MTBS-T.

Es ist zu erkennen, dass das Protein vor allem in den Fraktionen 1-3 eluiert wird. An den Ni²⁺-NTA-beads und in der Waschlösung ist kaum Protein detektierbar. Die niedrige Ausbeute ist nach mehrfacher Wiederholung am ehesten auf eine sehr geringe Grundexpression der Hefe zurückzuführen.

5 Diskussion

Aquaporine sind hoch effektive Wasserfilter, die Kationen einschließlich Protonen sehr wirksam ausschließen. Besonders der Mechanismus des Protonenausschlusses wird seit langem intensiv diskutiert, da Protonen nicht nur als H_3O^+ , sondern noch bedeutend schneller über Wasserketten via Grotthuss-Mechanismus geleitet werden können. Als Ursache für den Protonenausschluss in Aquaporinen wurde daher die Unterbrechung der Wasserkette im Zentrum der Pore durch die Wechselwirkung der hoch konservierten Asparagine der NPA-Region mit dem durchtretenden Wasser- molekül vermutet. In der aktuellen Literatur nimmt diese These zwar weniger Raum ein, trotzdem ging die Frage nach der Bedeutung der Koordinationsstellen in der NPA-Region auch in die Wahl der durchgeführten Mutationen in dieser Arbeit ein.

Als Hauptfiltermechanismus wird inzwischen übereinstimmend eine Energiebarriere angesehen, für deren Entstehung aber unterschiedliche Faktoren verantwortlich gemacht werden. Das Wort Energiebarriere übersetzt dabei nur unzureichend den englischen Begriff *free energy barrier*. Er beschreibt in molekulardynamischen Simulationen ermittelte Orte, an denen für ein Teilchen eine große Energiedifferenz zum Gleichgewichtszustand besteht. Das Gegenteil stellt zum Beispiel eine spezifische Bindungsstelle dar; hier befindet sich das Teilchen im Gleichgewichtszustand. Dieser Energieaufwand wird von verschiedenen Autoren für den Durchtritt eines Ions durch den Kanal berechnet und kann mit einem Wert in kcal/mol für jede Position im Kanal angegeben werden. Das Ergebnis wird in *free energy profiles* dargestellt. Der Ort mit dem höchsten Wert stellt die größte *free energy barrier* des Kanals dar und wird für Aquaporine übereinstimmend im Bereich der NPA-Region lokalisiert (Burykin und Warshel, 2003; de Groot *et al.*, 2003; Chakrabarti *et al.*, 2004; Ilan *et al.*, 2004; Jensen *et al.*, 2005).

Als deren Ursache werden unterschiedliche Effekte diskutiert: die notwendige Dehydratationsenergie für den Durchtritt eines Ions durch den engen Kanal (*desolvation penalty*), das Dipolmoment der beiden Halbhelices B und E und die direkte elektrostatische Abstoßung durch das Arginin der ar/R-Region.

Nachdem inzwischen Protonen leitende Aquaporine durch Mutationen in der ar/R- Region beschrieben wurden (Beitz *et al.*, 2006), scheint eine multifaktorielle Genese der Protonenbarriere wahrscheinlich. Dies konnte auch durch molekulardynamische Simulationen gestützt werden (Chen *et al.*, 2006).

5. Diskussion

Um den spezifischen Anteil der NPA-Region an den Kationenfiltermechanismen des Aquaporins einzuschränken, wurden hier drei neue Mutationen eingeführt:

Das positive elektrische Feld der Halbhelices B und E sollte kompensiert werden, indem die Asparagine N76 und N192 durch Aspartate ersetzt wurden.

Um die Ausrichtung der Moleküle in der Wasserkette im Inneren des Kanals und deren Koordination durch die Asparagine der NPA-Region zu beeinflussen, wurden diese auch durch Serin bzw. Alanin ersetzt und so die Bindungsstellen jeweils reduziert bzw. eliminiert.

Obwohl auf diese Weise primär der Protonenfilter beschrieben werden sollte, liefert die vorliegende Arbeit aufgrund der neuen Erkenntnisse auch einen Beitrag zur Aufklärung der Filtermechanismen der Aquaporine für Alkalikationen.

5.1 Die NPA-Region als Alkalikationenfilter

Die gefundenen Ergebnisse widerlegen die These, dass das Einführen einer negativen Ladung die Dipoleffekte in der NPA-Region kompensieren und so die Protonenbarriere beeinträchtigen könnte (Chakrabarti *et al.*, 2004). Dagegen wird die Vermutung gestützt, dass die Dipolwirkung der beiden Halbhelices einen Teil des Natriumionenfilters darstellt (Ko *et al.*, 2008).

Ein Austausch von Asparagin-nach-Aspartat in der NPA-Region führte zur Bildung funktioneller Wasserkäne (s. 4.3.2), obwohl der Austausch eines Wasserstoffbrückendonators durch einen -akzeptor einen großen Einfluss auf die Protein-Wasser-Wechselwirkung haben kann. So könnte sich die Orientierung des zentralen Wassermoleküls und damit möglicherweise die Wasserpermeabilität verändern. Es ist dabei auch bemerkenswert, dass der Austausch der an dieser Stelle hoch konservierten Aminosäure Asparagin und das Einführen einer negativen Ladung die strukturelle Integrität des Kanals nicht beeinträchtigte.

Entgegen der Arbeitshypothese wiesen AQP1 N76D und AQP1 N192D intakte Protonenfilter auf (s. 4.2.5, 4.4). Stattdessen fand sich in AQP1 N192D ein Natriumionenleck (s. 4.4), das eine Beteiligung der NPA-Region am Alkalikationenfilter der Aquaporine beweist. Möglicherweise ist das zentrale Asparagin die einzige einzeln eliminierbare Struktur mit Anteil am Alkalikationenfilter.

Die Mutanten mit einem Asparagin-nach-Alanin-Austausch unterschieden sich davon deutlich: AQP1 N76A und AQP1 N192A waren die beiden Mutationen mit der

größten zu erwartenden Wirkung auf die passierenden Wassermoleküle. Da Alanin keine funktionelle Gruppe für deren Koordination im Kanal aufweist, wurde ein starker Einfluss auf die Wasserpermeabilität vermutet. Indirekt könnte dadurch auch die Protonenpermeabilität verändert sein. Leider konnten diese theoretischen Annahmen nicht bestätigt werden, da es nicht gelang, Asparagin-nach-Alanin-Mutanten zu exprimieren. Eine mögliche Ursache liegt in der fehlenden Wasserstoffbrückenbindung zum Peptidrücken, die einen Grund für Faltungsprobleme darstellt (s. Abb. 4.1). In AQP1-Wildtyp dagegen bilden die beiden Asparagine in den NPA-Motiven Wasserstoffbrückenbindungen mit den NH-Gruppen von Valin79 und Arginin195 in der Hauptkette des Aquaporins zur Stabilisierung der Proteinstruktur (Murata *et al.*, 2000).

Ein Asparagin-nach-Serin-Austausch hatte keine Auswirkungen auf den Kationenausschluss. AQP1 N76S wies aber eine gering reduzierte Wasserpermeabilität auf.

5.2 **Kombinierte Mutationen in NPA- und ar/R-Region**

Die Kombination der untersuchten Mutationen in der NPA-Region mit den bekannten H180A/R195V-Mutationen in der ar/R-Region zeigte, dass sich die Kationenfilterfunktion der Aquaporine zwar artifiziell in einen Protonenfilter und einen Filter für andere Kationen trennen lässt, dass deren Wirkung aber *in vivo* synergistisch ist.

Die Tripelmutanten AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V boten ein überraschendes und uneinheitliches Bild, das sich nicht durch die einfache Addition einzelner Eigenschaften erklären ließ. Beide zeigten sowohl Protonen- als auch Ammonium- und Alkalikationenpermeabilität (s. 4.2, 4.4). Dabei war die Funktion als Wasserkanal um ca. 80% reduziert (s. 4.3.2).

Anders als zu vermuten, vervierfachte sich die Protonenpermeabilität von AQP1 H180A/R195V durch die Kombination mit N76D, wurde durch den Einfluss von N192D aber reduziert. AQP1 N76D, das alleine Kationen ausschließt, führt in der Kombination mit H180A/R195V zur deutlich größeren Alkalikationenpermeabilität verglichen mit AQP1 N192D/H180A/R195V (s. 4.4). Auch die Reduktion der Wasserpermeabilität lässt sich aus den Eigenschaften der Kombinationspartner nicht zufriedenstellend erklären.

Um abzusichern, dass die verminderte Wasserpermeabilität nicht auf eine reduzierte Expression zurückzuführen war, wurde zusätzlich zur Totalmembranfraktion auch die

5. Diskussion

Plasmamembranfraktion für AQP1-Wildtyp, AQP1 N76D und AQP1 N76D/H180A/R195V isoliert (s. 4.3.4) und eine vergleichbare Expressionsstärke gezeigt. Dabei fiel zwar ein unterschiedliches Glykosylierungsmuster von AQP1 N76D und AQP1 N76D/H180A/R195V auf (s. 4.3.4, Abb. 4.27), durch Untersuchungen mit AQP1 ist jedoch bekannt, dass eine Glykosylierung weder für den Einbau der Oligomere in die Membran noch für den Wassertransport nötig ist. Studienergebnisse zeigen, dass deglykosyliertes und natives AQP1 rekonstituiert in Proteoliposomen vergleichbare P_f -Werte aufweisen (van Hoek *et al.*, 1995).

Die Funktionalität von Fusionsproteinen dieser Mutanten mit pH-sensitivem GFP in den Oozyten-Schwelltests sowie der Expressionsnachweis durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie deuteten auf eine korrekte Proteininfaltung hin (s. 4.3.4, Abb. 4.28). Die Harnstoffpermeabilität von AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V als Zeichen einer intakten Kanalstruktur war zwar reduziert im Vergleich zu AQP1 H180A/R195V (50 bzw. 30%), jedoch erhalten (s. 4.3.3, Abb. 4.22). Die Permeabilitätsabnahme für das planare Harnstoffmolekül ist dabei am ehesten auf eine ungünstigere Koordination zurückzuführen, da das Sauerstoffatom des Harnstoffs nur noch mit dem verbleibenden Asparagin-Amidstickstoff interagieren kann und möglicherweise der Amidstickstoff des Harnstoffs mit den Sauerstoffatomen des Aspartatrestes wechselwirkt. Denkbar ist auch eine Ausbildung beider Interaktionen gleichzeitig, so dass die stärkere Bindung das Harnstoffmolekül länger in der Pore festhält und dadurch die Permeabilität reduziert. Der minimale Poredurchmesser konnte auf weniger als 3,4 Å eingegrenzt werden, da AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V Glycerol ausschlossen (s. 4.3.3, Abb. 4.23).

Durch die Kombination der beiden ND-Mutationen wurde AQP1 N76D/N192D erzeugt, um den erwarteten Effekt zur Elimination des elektrostatischen Feldes der beiden Halbhelices maximal zu verstärken. Diese sowie die Quadrupelmutante AQP1 N76D/N192D/H180A/R195V zeigten jedoch weder in der Hefe noch in Oozyten Funktionalität bei unterschiedlicher Expressionsstärke (s. 4.2.1, 4.2.2). Vermutlich wird durch das Einführen von zwei negativen Ladungen in die NPA-Region die korrekte Faltung des Proteins nicht mehr gewährleistet.

Durch den zusätzlichen Asparagin-nach-Serin-Austausch (N76S) verlor AQP1 H180A/R195V seine Protonenpermeabilität bei gleichbleibendem Ausschluss von Alkalikationen. AQP1 N76S/H180A/R195V war dabei weniger permeabel für Wasser, aber unverändert durchlässig für Ammoniak/Methylamin (s. 4.2.1, 4.2.2). Aus dieser Beobachtung lässt sich schließen, dass die Konservierung der Asparagine in der NPA-Region nicht in deren Bedeutung für den Kationenausschluss zu liegen scheint, denn eine (hypothetische) SPA-Region würde sogar einen stärkeren Protonenausschluss bewirken. Da die ar/R-Region diese Funktion aber vollständig erfüllen kann, erreicht das Aquaporin mit dem Asparagin in der Engstelle eine um 20% größere Wasserpermeabilität. Dabei scheinen SPA-Mutanten dem AQP1-Wildtyp strukturell äquivalent zu sein, was weiter zu dem Schluss führt, dass die Konservierung der zentralen Asparagine ihren Grund auch nicht in der Erhaltung der Struktur des Kanals hat, sondern in der Optimierung der Wasserpermeabilität unter Erhaltung seiner Filterfunktion.

5.3 Permeabilität der Kationen leitenden Mutanten

Wasserpermeabilität

Die Wasserpermeabilität von AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V war im Vergleich zum Wildtyp um 80% reduziert, jedoch noch immer vergleichsweise hoch.

Ein Einfluss des Protonierungszustandes der Aspartatreste in den beiden Tripelmutanten auf deren Wasserpermeabilität wurde durch Oozyten-Schwelltests bei unterschiedlichen pH-Werten ausgeschlossen (s. 4.3.2, Abb. 4.20). Der pK_s -Wert des Aspartatrestes (in Lösung bei 3,9) ist in Proteinen abhängig von der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen und der elektrostatischen Umgebung. Er kann also variieren und liegt am N-Terminus von Helices bei $2,8 \pm 0,5$ (Forsyth *et al.*, 2002). Bei einem pH-Wert von 2,5 müssten für $pK_s = 3,9$ schon 96%, bei $pK_s = 2,8$ etwa die Hälfte der Aspartatreste protoniert vorliegen und die Permeabilität wäre verändert.

Eine weitere Vermutung ging dahin, dass unter Umständen ein Kation die Pore der Tripelmutanten vorübergehend verstopft und damit die Wasserpassage reduziert. Dies konnte durch Messungen ausgeschlossen werden, in denen die gleiche Wasserpermeabilität in Lösungen gezeigt wurde, die bei gleicher Osmolarität frei von den permeierenden Ionenspezies waren.

Protonenpermeabilität

Die Protonenpermeabilität von AQP1 N76D/H180A/R195V betrug etwa $6 \cdot 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ (s. 4.4). Da Oozyten etwa 10^{11} AQP1-Moleküle pro cm^2 Membran exprimieren, kann hieraus die Unit-Permeabilität, d.h. die Permeabilität pro Aquaporinmolekül berechnet werden: $6 \cdot 10^{-15} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ (Zampighi *et al.*, 1995).

Die Leitfähigkeit, d.h. der Quotient aus dem gemessenen Strom und dem Transmembranpotenzial bei gegebener Ionenkonzentration, betrug $7 \cdot 10^{-6} \text{ S}$ bei pH 5,5 und Raumtemperatur, die entsprechende Unit-Leitfähigkeit etwa $7 \cdot 10^{-17} \text{ S}$.

Generell ist die Unit-Leitfähigkeit von Protonenkanälen verglichen mit anderen Kanälen um den Faktor 10^3 geringer (DeCoursey, 2008). Sie beträgt bei physiologischem pH-Wert $1,5 \cdot 10^{-14} \text{ S}$ und steigt auf einen Wert von $14 \cdot 10^{-14} \text{ S}$ bei pH 5,5 (Cherny *et al.*, 2003). Allerdings gibt es auch innerhalb der Protonenkanäle große Unterschiede in den Leitfähigkeiten. So konnte für den M2-Protonenkanal des Influenza A Virus nur eine extrem kleine Unit-Leitfähigkeit im Bereich von 10^{-17} S bei pH 5,7 bestimmt werden (Lin und Schroeder, 2001; Decoursey, 2003; Stouffer *et al.*, 2008), das ist weniger als bei AQP1 N76D/H180A/R195V.

Permeabilität für Alkalikationen

Es ist zu erwarten, dass der Mechanismus des Alkaliionentransports in den AQP1-Mutanten sich von dem in natürlich vorkommenden Ionenkanälen unterscheidet, denn diese sind strukturell optimiert auf die Ionenleitung, während diese Eigenschaft in den veränderten Aquaporinen nur die Konsequenz der Elimination einer Barriere darstellt. Die größte Kationenbarriere in Aquaporinen stellt möglicherweise die für Kationen ungünstige, weil für Wasser optimierte Kanalstruktur dar.

In Abbildung 5.1 ist beispielhaft die Architektur eines Kaliumkanals und eines Chloridkanals im Vergleich zu AQP1-Wildtyp und AQP1 N76D/H180A/R195V gezeigt.

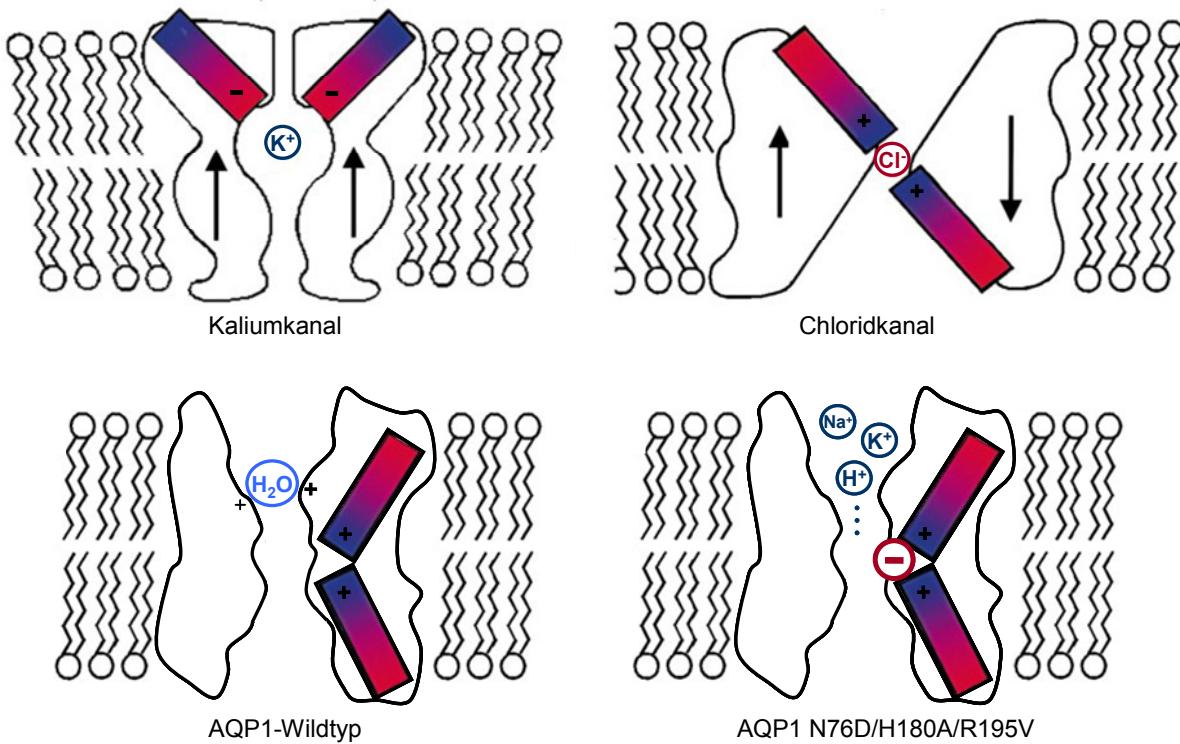


Abbildung 5.1: Architektur von Ionenkanälen (Kaliumkanal, Chloridkanal) im Vergleich zu AQP1-Wildtyp und der Tripelmutante AQP1 N76D/H180A/R195V (nach Dutzler et al., 2002)

Der Chloridkanal (am Beispiel eines CIC-Kanals aus *Escherichia coli*) besitzt eine sanduhrförmige Topologie mit dem Selektivitätsfilter, einer schmalen Konstriktion, in der Mitte der Membran. Er weist wie das Aquaporin eine antiparallele Struktur auf (Dutzler et al., 2002; Gouaux und MacKinnon, 2005) und liegt als Dimer vor, wobei jede Untereinheit wie bei den Aquaporinen eine eigenständige Pore bildet. Die antiparallelen Helices sorgen dafür, dass Ionen im Selektivitätsfilter in der Mitte des Kanals durch elektrostatische Interaktion mit deren positiven Enden und Koordination mit polaren Resten stabilisiert werden. Dies ist die Basis seiner Anionenselektivität.

Dagegen besitzen Kaliumkanäle eine parallele Struktur, vier identische Untereinheiten bilden eine zentrale Pore (Doyle et al., 1998). Vier nicht-membranspannende Helices zeigen mit ihren negativen Enden von der gleichen Seite der Membran in das Zentrum der Pore. Dies dient zur Erhöhung der Kationenselektivität und in Kombination mit einer großen wassergefüllten Höhle zur Stabilisierung der Kationen vor dem Selektivitätsfilter (Doyle et al., 1998; Hille et al., 1999; Roux und MacKinnon, 1999). Bei Eintritt in den Selektivitätsfilter verlieren die Kaliumionen ihre Hydrathülle. Als

5. Diskussion

Ersatz stehen vier potentielle Ionenbindungsstellen zur Verfügung, bei denen ein dehydratisiertes Kaliumion von jeweils acht Carbonylsauerstoffen koordiniert wird (Morais-Cabral *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001). Durch diese hochaffinen Bindungsstellen sind stets zwei, bei niedrigen Kaliumkonzentrationen ist ein Ion im Kanal vorhanden (Zhou und MacKinnon, 2003). Außerdem ist der Transport von Wassermolekülen und Ionen durch die räumliche Begrenzung streng gekoppelt, so dass sich im Ionenfilter immer ein Wassermolekül ober- und unterhalb des Ions in einer *single-file*-Anordnung befindet (Zhou *et al.*, 2001). Das Wasser-Ionen-Kopplungsverhältnis konnte für den HERG-Kaliumkanal der Herzmuskelzellen mit 1,4 bestimmt werden (Trudeau *et al.*, 1995; Ando *et al.*, 2005). Da Kaliumkanäle meist eine sehr hohe Permeabilität für Ionen aufweisen, ist die resultierende Wasserpermeabilität dementsprechend groß (Pohl, 2004).

Die Reduktion der elektrostatischen Abstoßung durch die Helixdipole in AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V führt dazu, dass Kationen permeieren können, wobei zusätzlich mit dem Carbonylsauerstoff des Aspartatrestes ein weiterer Koordinationspartner zur Verfügung steht, der den Kationenfluss erleichtert. In AQP1-Wildtyp zeigen an dessen Stelle die Asparaginreste N76 und N192 mit ihren Amidstickstoffen in die NPA-Region.

Die reduzierte Kationenleitfähigkeit von AQP1 N192D/H180A/R195V bezogen auf AQP1 N76D/H180A/R195V könnte dabei an einer relativ ungünstigeren Ausrichtung des Aspartatrestes 192 im Vergleich zu Aspartat 76 liegen.

Einen weiteren Grund für die Kationenpermeabilität der AQP1-Tripelmutanten kann die Erweiterung der Porenöffnung darstellen, die durch die Mutationen in der ar/R-Region mit einer Breite von 2,9 Å und einer Länge von 8,3 Å im Vergleich zu AQP1-Wildtyp um den Faktor sieben vergrößert ist (Beitz *et al.*, 2006). Somit könnten in dieser erweiterten Poreneingangsregion noch zwei weitere Wassermoleküle seitlich des Kations zu dessen Koordination beitragen.

Ursächlich für die verglichen mit originären Ionenkanälen geringe Permeabilität für Kationen von AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V ist wahrscheinlich die relativ geringere Anzahl von Carbonylsauerstoffen, die für die Koordination des Kations und die Substitution der Hydrathülle zur Verfügung stehen. Innerhalb des Kanals können nur vier Koordinationsstellen des hindurchtretenden

Kations besetzt werden, zwei durch die Sauerstoffe der Carbonylleiter und zwei durch die Wassermoleküle ober- und unterhalb des Kations. Denkbar ist auch, dass die permeierenden Ionen zusätzlich zu der geringen Zahl an Bindungsstellen auch durch deren suboptimale Positionierung im Durchtritt behindert werden, oder dass aufgrund einer starken Interaktion mit dem negativ geladenen Aspartatrest das Kation lange an dieser Stelle des Kanals verweilt und der Kationenfluss dadurch gebremst wird.

Die Größenordnung der Ionenpermeabilität muss im Zusammenhang mit ihren physiologischen Konsequenzen beurteilt werden. Aus dieser Perspektive lässt sich auch eine Erklärung dafür ableiten, warum schon eine schwache Filterwirkung große Relevanz hat. Da die Expressionsrate von Aquaporinen in der Membran ein Vielfaches über der typischer Ionenkanäle liegt, kann der minimale Kationenfluss, den die beschriebenen Strukturen in AQP1-Wildtyp verhindern, über das Schicksal der Zelle entscheiden. AQP1 N76D/H180A/R195V exprimierende Oozyten zeigten eine deutlich reduzierte Lebensdauer.

5.4 Selektivität der Kationen leitenden Mutanten

Der Durchtritt eines Kations durch die Tripelmutanten ist im Vergleich zum Wasserdurchtritt selten. In AQP1 N76D/H180A/R195V ist es nur ein Kaliumion pro 4000 bzw. ein Natriumion pro 8000 Wassermoleküle.

In Tabelle 5.1 ist die berechnete relative Ionenpermeabilität der Aquaporinmutanten bezogen auf die jeweilige Wasserpermeabilität aufgeführt. Die osmotische Wasserpermeabilität von Aquaporinen wird als P_f -Wert angegeben und bezieht sich auf eine mittlere Oozytenoberfläche von $0,045 \text{ cm}^2$. Hier wird die Oberfläche ausgehend von einer ideal sphärischen Oozyte mit einem Durchmesser von 1,2 mm berechnet.

Für die Berechnung der Ionenpermeabilität wird dagegen definitionsgemäß die wahre Oberfläche von $0,53 \text{ cm}^2$ als Bezugsgröße verwendet, die Oberflächenvergrößerungen durch Falten und Mikrovilli berücksichtigt (Zampighi *et al.*, 1995). Es ergeben sich daraus die sogenannten L_p -Werte.

5. Diskussion

	$R(H^+) [10^{-1}]$	$R(Na^+) [10^{-5}]$	$R(K^+) [10^{-5}]$
rAQP1 wt	0,18	0,03	0,13
N76D	0,25	0,07	0,12
N192D	0,5	0,63	0,52
H180A/R195V	0,79	0,02	0,25
N76D/HA/RV	18,7	12,8	23,8
N192D/HA/RV	3,1	2,9	4,8

Tabelle 5.1: relative Ionenpermeabilität (R) für Protonen, Natrium- und Kaliumionen bezogen auf die jeweilige Wasserpermeabilität L_p (berechnet aus P_f) von AQP1-Wildtyp und -Mutanten

Spannungsgesteuerte Protonenkanäle sind selektiv für Protonen gegenüber anderen Ionen mit einem Quotienten $> 10^6\text{-}10^8$ (Cherny *et al.*, 2003; DeCoursey, 2008). AQP1 H180A/R195V mit einer intakten NPA-Region ist weniger protonenselektiv mit $P(H^+)/P(Na^+) \approx 4 \cdot 10^5$ und $P(H^+)/P(K^+) \approx 4 \cdot 10^4$. Da AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V eine Permeabilität für Alkalikationen aufwiesen, lag bei diesen der Quotient im Vergleich dazu noch mindestens um den Faktor 30 (für Na^+) und 5 (für K^+) darunter.

Unter physiologischen Bedingungen ist die Protonenkonzentration jedoch viel niedriger als die Natrium- und Kaliumkonzentration (Decoursey, 2003). Bei 100 mM NaCl ergibt sich eine konzentrationsabhängige Unit-Natriumleitfähigkeit von $3 \cdot 10^{-16}$ S, die viermal höher ist als die Protonenleitfähigkeit.

Selektivität kann daraus entstehen, dass die verfügbaren Bindungsstellen innerhalb eines Kanals für ein spezielles Ion besonders geeignet sind und für andere Ionen ungünstig liegen. Bereits kleine Änderungen der Winkel und Abstände an Koordinationsstellen können in Proteinen große Auswirkungen haben. Dieses wird zum Beispiel im Kaliumkanal bei der Selektion von Kalium- und Natriumionen ausgenutzt (Zhou *et al.*, 2001; Noskov und Roux, 2006).

Typische Kaliumkanäle wie KcsA aus *Streptomyces lividans* sind um den Faktor 10^4 stärker permeabel für Kalium- gegenüber Natriumionen (Doyle *et al.*, 1998), denn der Abstand der Carbonylsauerstoffe im Selektivitätsfilter passt exakt für ein Kaliumion mit einem Durchmesser von 2,66 Å. Ein Natriumion ist mit einem Durchmesser von 1,8 Å zu klein für einen optimalen Kontakt zu den Koordinationsstellen. Somit kann

der Energieaufwand für die Dehydratisierung nicht kompensiert werden. Kanäle, die Natrium- und Kaliumionen leiten, wie der NaK Kanal aus *Bacillus cereus*, besitzen dafür einen etwas breiteren und weniger rigiden Selektivitätsfilter mit nur zwei statt vier Kationenbindungsstellen (Shi *et al.*, 2006).

AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V weisen eine geringe Selektivität von weniger als 2:1 für Kalium- gegenüber Natriumionen auf, bei geringer Gesamtpermeabilität. Dies bedeutet, dass die Koordination dieser Kationen in der Pore durch die Carbonylsauerstoffe der Aquaporin-Tripelmutanten relativ unspezifisch zwar möglich ist, dabei aber für beide Kationenspezies energetisch so ungünstig zu sein scheint, dass nur eine schwache Permeabilität resultiert.

Eine andere denkbare Ursache für den Unterschied in der Permeabilität liegt darin, dass die Ionen bei der Passage durch das Aquaporin noch teilweise hydratisiert sein könnten. Da hydratisierte Kationen erst ab einem angenommenen maximalen Durchmesser über 3,4 Å ausgeschlossen werden, hätten in diesem Fall Kaliumionen mit einem effektiven Hydratationsradius von 2,2 Å Vorteile gegenüber Natriumionen (3,4 Å).

5.5 Zusammenspiel von zwei Filterregionen

In der vorliegenden Arbeit wurde die NPA-Region als Alkalikationenfilter identifiziert. Außerdem wurde gezeigt, dass die elektrostatische Abstoßung in dieser Region nicht ausreicht, um Protonen auszuschließen. In AQP1-Wildtyp erlauben die in die Pore zeigenden Amidstickstoffe der beiden Asparaginreste (N76, N192) als Wasserstoffbrückendonatoren die schnelle Passage von Wassermolekülen. Da auch Hydroxoniumionen als Wasserstoffbrückenakzeptoren fungieren könnten, werden sie hier trotz des elektrostatischen Feldes der beiden Halbhelices nicht vollständig ausgeschlossen. Alkalikationen werden dagegen blockiert, da Sauerstoffatome für deren Koordination fehlen.

Die ar/R-Region wurde bereits als Protonenfilter beschrieben. Durch Mutation des in wasserselektiven Aquaporinen konservierten Histidins zum Alanin bzw. des Arginins zum Valin wurde in AQP1 R195V und AQP1 H180A/R195V die Polarität der ar/R-Region reduziert und der Porendurchmesser erweitert (Beitz *et al.*, 2006). Das

5. Diskussion

Arginin an Position 195 sorgt mit seiner positiven Ladung für den Protonenausschluss, welcher durch H180 noch verstärkt wird.

Der vollständige Kationenausschluss in Aquaporinen ist die Folge des Zusammenspiels dieser zwei Filterregionen (s. Abb. 5.2).

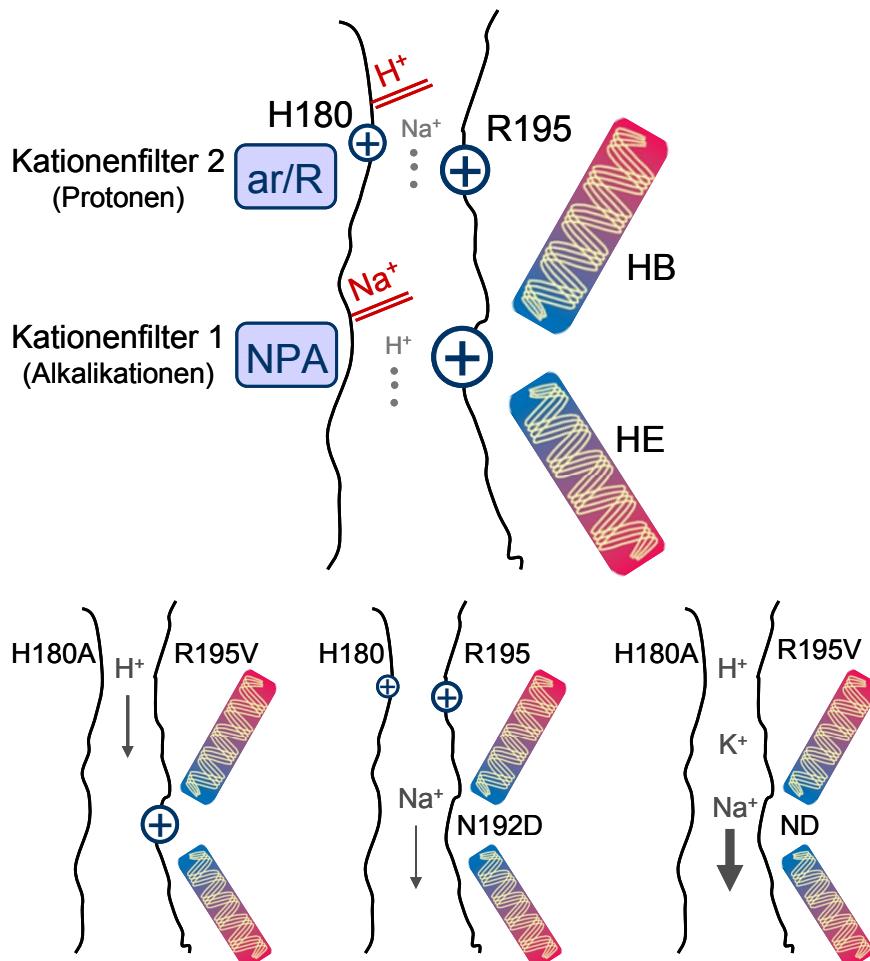


Abbildung 5.2: Oben: Modell der beiden Kationenfilter in AQP1

Unten: Zerstörung der Filtereigenschaften durch Punktmutationen: Protonenleck durch AQP1 H180A/R195V, Natriumionenleck durch AQP1 N192D, Kationenpermeabilität durch AQP1 ND/H180A/R195V

Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu Publikationen, die den Hauptprotonenfilter im Bereich der NPA Region vermuten (de Groot *et al.*, 2003; Chakrabarti *et al.*, 2004) oder der ar/R-Region eine Bedeutung für den Protonenfilter komplett absprechen (Chakrabarti *et al.*, 2004; Jensen *et al.*, 2005).

Mehrere Autoren zeigen jedoch *free-energy-profiles* für den simulierten Protonendurchtritt durch ein Aquaporin, die zwei Maxima aufweisen: Ein kleineres im Bereich der ar/R-Region, ein großes im Bereich der NPA-Region (de Groot *et al.*, 2003;

Chakrabarti *et al.*, 2004; Ilan *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007a). Diese Berechnungen passen gut zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, ebenso wie ein von Ko *et al.* publiziertes *free-energy-profile* für den Durchtritt eines Natriumions durch ein Aquaporin mit einem Maximum im Bereich der NPA-Region (Ko *et al.*, 2008).

Chen *et al.* zeigen zusätzlich in einer Simulation bereits für AQP1 H180A/R195V mit eliminiertem Protonenfilter ein deutlich reduziertes Maximum über der NPA-Region (8 gegenüber 28 kcal/mol in AQP1-Wildtyp) und die Elimination des kleineren Maximums im Bereich der ar/R-Region (Chen *et al.*, 2006). Sehr interessant wäre die Simulation eines Protonendurchtritts durch die neu geschaffenen Tripelmutanten mit ihrer deutlich höheren Kationenpermeabilität. Hier ist aufgrund der Eigenschaften der kombinierten Mutanten ein großer Effekt zu erwarten.

Es bleibt bemerkenswert, dass die Effekte der beiden Regionen sich nicht einfach addieren. Wird die Mutation N76D mit H180A/R195V kombiniert, so verstärkt sich die Gesamtpermeabilität für Protonen und Alkalikationen deutlich mehr, als die Eigenschaften der beiden Einzelregionen das erwarten ließen. Dies bedeutet eine synergistische Wirkung der beiden Engstellen. Interessanterweise scheint die Kooperation nicht nur in Bezug auf den Protonenausschluss zu bestehen, sondern auch im Hinblick auf die Effizienz des Aquaporins als Wasserkanal, denn durch die Kombination der Mutation in beiden Regionen büßt das Aquaporin seine Eigenschaft als optimierter hocheffizienter Wasserkanal ein. Möglicherweise wird erst durch die Kombination der Mutationen in den beiden nah beieinander liegenden Engstellen die elektrostatische Umgebung innerhalb des Aquaporins so stark abgewandelt, dass die Wechselwirkungen zwischen den Wassermolekülen und dem Protein beeinträchtigt sind (Chakrabarti *et al.*, 2004). Dieser Effekt einer komplexe veränderten Wechselwirkung erklärt möglicherweise, dass nicht nur positive Verstärkung möglich ist: Die Kombination der Mutation H180A/R195V mit N192D führt beispielsweise zu reduzierter Protonenpermeabilität.

In der Konsequenz bedeutet dies, dass es vielleicht unmöglich ist, die beiden Regionen in ihren Funktionen scharf voneinander abzugrenzen. Die räumliche Nähe von N192 zu R195 mit Lokalisation in derselben Schleife und die synergistische Wirkung in den Tripelmutanten bezogen auf den Kationenausschluss und die Wasserpermeabilität lassen die Vermutung zu, dass die Beschreibung zweier einzelner Filter artifiziell ist. Da sie sich im realen Aquaporin funktionell nicht trennen

lassen, kann man die beiden Engstellen als zwei Teile desselben Filters ansehen, die sich gegenseitig in ihrer Wirkung bedingen und verstärken.

5.6 Mögliche evolutionäre Entwicklung der beiden Kationenfilter

Major intrinsic proteins (MIP) wurden in Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren gefunden (Engel und Stahlberg, 2002). Darin sind die NPA-Motive in den Halbhelices B und E hoch konserviert. Aquaporine wie AqpM aus dem Archaeabakterium *Methanothermobacter marburgensis*, das Aquaglyceroporin GlpF und das wasserselektive AqpZ aus *Escherichia coli* weisen die NPA-Sequenzen auf und zeigen, dass diese schon früh in der Evolution auftraten und erhalten blieben (Fu *et al.*, 2000; Borgnia und Agre, 2001; Savage *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu den innerhalb der MIP-Familie am höchsten konservierten Motiven der NPA-Region enthält die ar/R-Region am Poreneingang variable Aminosäurereste (Zardoya, 2005).

Auf der Basis der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse ist eine Entstehung der Kationenfilter in zwei Etappen denkbar:

Zunächst entwickelten Urzellen durch Genduplikation einen Kanal, der die NPA-Motive bereits enthielt. Durch die Wirkung der NPA-Region wurden Alkalionen ausgeschlossen, allerdings konnte weiterhin eine kleine Menge Protonen durch den Kanal hindurchströmen. Diesen frühen Aquaporinen war die Selektion einzelner Stoffe noch nicht möglich. Später wurde durch den Einbau eines Argininrestes in der ar/R-Region der Protonenfluss hoch wirksam unterbunden. Zusätzlich wurde durch die Entwicklung unterschiedlicher Poredurchmesser und Polarität der ar/R-Region eine Spezifität für Substrate geschaffen. Es entstanden Aquaporine und Aquaglyceroproteine, die in der Lage waren, die Zelle mit benötigten Substraten zu versorgen.

Vermutlich entwickelten sich so die heutigen spezialisierten Aquaporine mit zwei synergistischen Kationenfiltern in der NPA-Region und in der ar/R-Region, die Stoffe ausschließen oder benötigte Substanzen selektiv in die Zelle einströmen lassen.

5.7 Diskussion der Methoden

Zur Untersuchung der Mutanten wurde *Saccharomyces cerevisiae* als Testsystem gewählt, da die Charakterisierung von AQP-Mutanten in unserem Arbeitskreis bereits erfolgreich in der Hefe durchgeführt und die Expression gezeigt worden war (Beitz *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2008). Aufgrund des schnellen Wachstums der Hefezellen – die Generationszeit beträgt etwa 90 min in Vollmedium – ist die Testdauer relativ kurz; dabei lassen sich Hefen als anspruchslose Organismen günstig kultivieren. Gleichzeitig können in Hefezellen für phänotypische Assays relativ leicht Gene ausgeschaltet werden, und sie lassen sich problemlos transformieren. In Hefeassays werden dann phänotypische Merkmale wie Zellwachstum oder Überleben unter normalen und unter definierten Stressbedingungen bestimmt, so dass Aussagen über die Auswirkungen der Testparameter auf die Physiologie der Hefezellen getroffen werden können. Phänotypische Hefeassays eignen sich zum Screening einer großen Anzahl an Mutanten wie in der vorliegenden Arbeit. Es konnten so Funktions-tests durchgeführt und physiologisch relevante Kationenpermeabilität erkannt werden.

Die im Verlauf eingesetzte *Bioscreen*-Technik hat sich im direkten Vergleich als das präzisere und komfortablere Instrument für diesen Zweck erwiesen. Die Nachteile der Hefewachstumsassays bestehen in einer eher geringen Sensitivität und darin, dass keine quantitativen Aussagen über die ionenspezifische Permeabilität getroffen werden können. Phänotypische Merkmale müssen visuell beurteilt werden. Wachstumskurven mit dem *Bioscreen* machen dagegen semiquantitative Bestimmungen in Relation zum Referenzprotein möglich. Am Beispiel des Natriumlecks von AQP1 N192D zeigte sich jedoch, dass eine sehr kleine Permeabilität auch in diesem System unter Umständen nicht detektiert wird.

Für die Evaluation der Wasserpermeabilität wurden *Xenopus laevis* Oozyten ausgewählt. Dieses Expressionssystem wurde wegen seiner bemerkenswert geringen Membranwasserpermeabilität bereits für die Funktionsaufklärung des CHIP28, d.h. des AQP1 genutzt und ist eine gebräuchliche Methode zur Bestimmung der Wasserpermeabilität durch direkte Messung des Zellvolumens (Preston *et al.*, 1992). Es erwies sich als robust und lieferte gut reproduzierbare Ergebnisse.

5. Diskussion

Um die Expression in der Plasmamembran quantifizieren zu können, wurde zu deren Isolation ein erst 2007 publiziertes Verfahren eingesetzt, bei dem die Vitellinmembran der Oozyten enzymatisch partiell verdaut und anschließend die Plasmamembran mit kolloidalem, kationischem Siliciumdioxid und Polyacrylsäure polymerisiert wird (Chaney und Jacobson, 1983). Dadurch ergeben sich große Membranblättchen, die durch stufenweise Zentrifugation bei geringer Umdrehungszahl aufgereinigt werden können (Leduc-Nadeau *et al.*, 2007). Der große Vorteil dieses Verfahrens im Vergleich z.B. zur Dichtegradientenzentrifugation (Hill *et al.*, 2005) ist der bei einzeln manuell injizierten Oozyten noch vertretbare Aufwand. Da die für verlässliche Resultate mindestens notwendige Menge von 25 Oozyten pro SDS-PAGE-Spur sowie die einzukalkulierenden Verluste während der Behandlung eine große Menge injizierter Oozyten notwendig macht, bleibt dieser beträchtlich.

Im Rahmen dieser Arbeit entstand die Idee, die generierten Protonen leitenden Mutanten an ein pH-sensitives GFP zu koppeln, um den Protoneneinstrom direkt *in vivo* in einem geeigneten Expressionssystem messen zu können. Das pHluorin sollte als Sensor unmittelbar am Kanal direkt auf den Protonenfluss reagieren.

In *Saccharomyces cerevisiae* war die Expression von pHluorin sowie auch die Expression von GFP-Fusionen mit Membranproteinen bereits gezeigt worden (Drew *et al.*, 2008; Orij *et al.*, 2009), und die Funktionalität des Fusionskonstruktes mit pHluorin am N-Terminus von AQP1 wurde konfokalmikroskopisch nachgewiesen (s. 4.5.1, Abb. 4.33). Von Aquaporinen, die mit einem GFP am N-Terminus fusioniert wurden, ist auch bekannt, dass sie ihre funktionelle Aktivität bewahren (Hoque *et al.*, 2000; Ikeda *et al.*, 2002; Tsunoda *et al.*, 2004).

Der intrazelluläre pH-Wert veränderte sich in allen untersuchten Zellen unerwartet heftig, so dass in den Verläufen des Fluoreszenzemissionsverhältnisses keine plausible Veränderung detektiert werden konnte (s. 4.5.1, Abb. 4.35). Auch variierten die Ergebnisse stark. Erschwerende Faktoren könnten die Protonendurchlässigkeit der Hefezellmembran sowie die Aktivität der Protoneneffluxsysteme sein (Martinez-Munoz und Kane, 2008).

Bei der Expression in Porree-Epidermiszellen konnte die korrekte Lokalisation nicht eindeutig gezeigt werden. Trotz geringer Autofluoreszenz zeigten sich in den dennoch unternommenen Versuchen erneut keine verwertbaren Unterschiede in den Kurvenverläufen der Konstrukte (s. 4.5.2).

HEK-293-Zellen wurden bereits von zahlreichen Gruppen für die Expression von Aquaporin-GFP-Fusionskonstrukten erfolgreich verwendet (Hoque *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2005). Bei der konfokalmikroskopischen Untersuchung der Zellen fielen neben morphologischen Veränderungen insbesondere die granulösen Einschlüsse als Zeichen der Retention der Fusionsproteine im endoplasmatischen Retikulum bei insgesamt schwacher Plasmamembranfluoreszenz auf, welche auch durch längere Inkubation nicht wesentlich erhöht werden konnte (s. 4.5.3). Toxische Ursachen für dieses Ergebnis wurden diskutiert, doch zytotoxische Effekte von GFP auf Organismen wurden nur vereinzelt berichtet (Liu *et al.*, 1999).

Möglicherweise war die nachzuweisende Protonenpermeabilität der untersuchten Mutante generell zu gering, um bei hohem Hintergrundprotonenstrom detektiert zu werden. Unter Umständen ließen sich durch einen anderen Versuchsaufbau mit besserer Einstellung der Flussrate und Messung des Fluoreszenzverhältnisses in kleineren Zeitintervallen in einem Expressionssystem mit geringer intrinsischer Protonenpermeabilität dennoch Unterschiede zwischen den Konstrukten feststellen.

5.8 Ausblick

In Kooperation mit Prof. Pohl (Universität Linz) ist die Rekonstitution des gereinigten AQP1 N76D/H180A/R195V in Liposomen und dessen Einbau in eine künstliche *bilayer*-Membran geplant. Auch könnte dort humanes AQP1 N76D/H180A/R195V getestet werden, um einen Einfluss speziespezifischer Unterschiede auszuschließen.

Möglicherweise könnte man auch gereinigte pHluorin-Aquaporin-Fusionsproteine in Liposomen rekonstituieren und so das elegante Verfahren der direkten Messung von Protonenströmen durch das Aquaporin erfolgreich etablieren.

Alternativ könnte dies eventuell auch durch stabile Transfektion in HEK-293-Zellen oder einer anderen, robusteren Zelllinie geschehen.

Als dritte Möglichkeit ist eine Koexpression von Aquaporin und pHluorin in *Allium porrum* denkbar, ohne diese beiden zu fusionieren. So würde vielleicht eine höhere pHluorin-Konzentration intrazellulär erreicht. Allerdings müsste der Expressionsort des Aquaporins in diesem Versuch durch Immunlokalisation überprüft werden. Die entsprechenden Konstrukte wurden bereits hergestellt.

5. Diskussion

Doch auch die bereits durchgeführten Verfahren könnten weiterentwickelt werden: Hefewachstumsassays sollten beispielsweise in Form von *Bioscreen*-Untersuchungen durchgeführt werden, da diese präzisere und untereinander besser vergleichbare Ergebnisse liefern als die Tests auf Agarmedien. Interessant wäre dabei z.B. die Umsetzung von pH-Stresstests mit einem Hefestamm mit deletierten Protoneneffluxpumpen. Durch die fehlende zelluläre Gegenregulation könnte der direkte physiologische Einfluss des Protoneneinstroms detektiert werden.

Von den untersuchten Mutanten erschien AQP1 N76D/R195V interessant, da es in der Hefe sicher exprimiert wurde, jedoch in Kontrollmedien fast immer ein stark reduziertes Wachstum zeigte. Nach dem noch ausstehenden Nachweis einer Plasmamembranexpression könnte die elektrophysiologische Charakterisierung aufschlussreich sein, um weitere Hinweise über Interaktionen zwischen NPA- und ar/R-Region zu erhalten.

Von großem Interesse wären in diesem Zusammenhang auch molekulardynamische Untersuchungen von AQP1 N76D/H180A/R195V. Insbesondere das *free energy profile* für den Protonentransport durch den Kanal wird Veränderungen zeigen und könnte zusätzliche Hinweise auf die Verteilung der Beiträge zur Energiebarriere in Aquaporinen erbringen. Der experimentelle Nachweis der Arbeitsteilung der beiden Engstellen hat jedoch bereits gezeigt, dass Simulationen alleine nicht ausreichen, um die Aquaporinfunktion im Detail zu verstehen.

6 Zusammenfassung

Aquaporine sind äußerst effiziente und selektive Wasserporen. Zwei hoch konservierte Engstellen werden dabei als Selektivitätsfilter vermutet: Die aromatische/Arginin (ar/R)-Region am Poreneingang und die Asparagin-Prolin-Alanin (NPA)-Region in der Mitte des Kanals. Um die beiden Engstellen bezüglich ihrer Filtereigenschaften für Kationen zu charakterisieren, wurden Punktmutationen an den Asparaginen in der NPA-Region (N76 und N192) in AQP1 aus der Ratte durchgeführt.

Diese wurden mit der H180A/R195V-Mutation in der ar/R-Region kombiniert, welche im Vorfeld bereits zu gering Protonen leitenden Aquaporinen geführt hatte.

Alle 14 generierten Mutanten wurden in *Saccharomyces cerevisiae*-Wachstumsassays auf Permeabilität für Protonen, Methyl-/Ammonium-, Kalium- und Natriumionen getestet. In Kooperation mit Prof. Zeuthen (Universität Kopenhagen) wurde die Ionenpermeabilität zusätzlich durch elektrophysiologische Messungen an *Xenopus laevis* Oozyten quantifiziert. Die Bestimmung der Wasser-, Harnstoff- und Glycerolpermeabilität erfolgte in *Xenopus laevis* Oozyten-Schwelltests.

Der Asparagin-nach-Aspartat-Austausch führte in AQP1 N192D zu einem Natriumionenleck. Die Wasserpermeabilität war verglichen mit AQP1-Wildtyp um 60% reduziert bei 40% geringerer Expression. Wasserpermeabilität und Expressionsniveau von AQP1 N76D waren vergleichbar mit AQP1-Wildtyp, ohne Nachweis einer Permeabilität für Kationen.

Die Tripelmutanten AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V zeigten Permeabilität für Protonen, Natrium-, Kalium- und Ammoniumionen. Mit einer Reduktion der Wasserpermeabilität von etwa 80% war gleichzeitig die Eigenschaft als originärer Wasserkanal deutlich verändert. Diese beiden Tripelmutanten erlaubten die Passage von Harnstoff, nicht jedoch von Glycerol, so dass der kleinste Poredurchmesser auf 3,2-3,4 Å geschätzt werden kann. Das Expressionsniveau von AQP1 N76D/H180A/R195V und AQP1 N192D/H180A/R195V war vergleichbar mit dem von AQP1-Wildtyp.

Mutanten mit zwei negativen Ladungen in der NPA-Region (AQP1 N76D/N192D, AQP1 N76D/N192D/H180A/R195V) zeigten keinerlei Funktion.

Die fehlende bzw. minimale Expression aller Mutanten mit Asparagin-nach-Alanin-Austausch (AQP1 N76A, AQP1 N192A, AQP1 N76A/R195V, AQP1 N76A/H180A/R195V) ohne Nachweis einer Funktionalität deutete auf eine Fehlfaltung des Proteins hin.

6. Zusammenfassung

Mutationen mit Asparagin-nach-Serin-Austausch (AQP1 N76S und AQP1 N76S/H180A/R195V) zeigten um etwa 20% reduzierte Wasserpermeabilität und schlossen Kationen aus. Die Ammoniak- und Methylaminpermeabilität von AQP1 N76S/H180A/R195V entsprach derjenigen von AQP1 H180A/R195V.

Zur *in vivo* Messung der intrazellulären pH-Änderung von Protonen leitenden Mutationen wurden diese mit pH sensitivem GFP (pHluorin) fusioniert. *Saccharomyces cerevisiae*, *Allium porrum*-Epidermiszellen und HEK-293-Zellen wurden als Expressionssysteme getestet. In *Saccharomyces cerevisiae* konnte zwar eine Expression der Fusionsproteine in der Plasmamembran gesichert werden, jedoch erwies sich das Verfahren bisher insgesamt als zu unempfindlich.

Diese Arbeit hat die wichtige Rolle beider Engstellen beim Kationenausschluss von Aquaporinen experimentell gezeigt. Der Kationenfilter ist eine Funktion beider Engstellen, die synergistisch zusammenwirken: Die NPA-Region filtert Kationen wie Natrium- und Kaliumionen sowie auch Protonen, die ar/R-Region macht den Protonenausschluss mit der positiven Ladung des Arginins perfekt.

7 Summary

Aquaporin (AQP) water transport is marked by high flux rates and almost perfect specificity for the H₂O molecule. Two evolutionary highly conserved constrictions are thought to act as selectivity filters for cations: The aromatic/arginine (ar/R) constriction at the pore mouth and the asparagine-proline-alanine (NPA) region in the centre of the pore. In order to characterize the role of these constrictions in the cation exclusion process, the asparagines of rat AQP1 (N76 and N192), located in the NPA region were mutated. In addition to asparagine mutations, combined mutations with H180A and R195V in the ar/R region, previously shown to cause proton leaks, were investigated.

All 14 mutants were tested using phenotypic *Saccharomyces cerevisiae* growth assays for permeability of protons, (methyl-) ammonium, potassium and sodium ions. In cooperation with Prof. Zeuthen (University of Copenhagen) the ion permeability of the mutants was quantified electrophysiologically in *Xenopus laevis* oocytes. Measurements for permeability of water, urea and glycerol were performed in *Xenopus laevis* oocyte swelling assays.

The asparagine to aspartate exchange caused a sodium leak in AQP1 N192D. Water permeability was decreased by 60% compared to wild type AQP1. This result was supported by 40% reduction in protein expression. AQP1 N76D showed properties similar to that of the wild type, without any permeability for cations.

The triple mutants AQP1 N76D/H180A/R195V and AQP1 N192D/H180A/R195V showed permeability for protons, sodium, potassium and ammonium ions, but permeability for water was decreased in both mutants by 80%. Therefore, these mutations drastically restricted the functionality of aquaporins as water channels. The minimum pore diameter was estimated to be 3.2 to 3.4 Å as passage of urea but not glycerol was possible. Expression levels of both triple mutants were comparable to wild type AQP1.

Mutants with two negative charges in the NPA region (AQP1 N76D/N192D, AQP1 N76D/N192D/H180A/R195V) were non-functional.

All mutants with an asparagine to alanine exchange (AQP1 N76A, AQP1 N192A, AQP1 N76A/R195V, AQP1 N76A/H180A/ R195V) were non-functional and showed no or only minimal protein expression indicating possible misfolding.

Asparagine to serine exchange (AQP1 N76S und AQP1 N76S/H180A/R195V) lead to 20% reduction in water permeability but cation exclusion remained intact. Proper-

7. Summary

ties for ammonia and methylamine permeability of AQP1 N76S/H180A/R195V were the same as for AQP1 H180A/R195V.

It was attempted to measure the intracellular pH shift *in vivo* using mutants with proton permeability in fusion with pH sensitive GFP (pHluorin). *Saccharomyces cerevisiae*, *Allium porrum* epidermal cells and HEK-293-cells were tested as expression systems. Conclusive plasma membrane expression could only be shown in *Saccharomyces cerevisiae*, the sensitivity, however, of the method was not sufficient to detect any differences in pH changes.

In conclusion, this work has experimentally shown the vital role of the constrictions in the cation exclusion process of aquaporins. Most importantly, it was demonstrated that cation exclusion is a synergistic process of both constrictions whereby the NPA region filters potassium and sodium ions as well as protons to a certain extent and the ar/R-region completes the proton filtration with its positively charged arginine.

8 Literaturverzeichnis

Agre, P., King, L. S., Yasui, M., Guggino, W. B., Ottersen, O. P., Fujiyoshi, Y., Engel, A. and Nielsen, S. (2002). "Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine." J Physiol 542: 3-16.

Agre, P. and Kozono, D. (2003). "Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases." FEBS Lett 555: 72-78.

Agre, P., Preston, G. M., Smith, B. L., Jung, J. S., Raina, S., Moon, C., Guggino, W. B. and Nielsen, S. (1993). "Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel." Am J Physiol 265: F463-476.

Anderson, J. A., Huprikar, S. S., Kochian, L. V., Lucas, W. J. and Gaber, R. F. (1992). "Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*." Proc Natl Acad Sci U S A 89: 3736-3740.

Ando, H., Kuno, M., Shimizu, H., Muramatsu, I. and Oiki, S. (2005). "Coupled K+-water flux through the HERG potassium channel measured by an osmotic pulse method." J Gen Physiol 126: 529-538.

Ashby, M. C., Ibaraki, K. and Henley, J. M. (2004). "It's green outside: tracking cell surface proteins with pH-sensitive GFP." Trends Neurosci 27: 257-261.

Banuelos, M. A., Sychrova, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J. L. and Potier, S. (1998). "The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux." Microbiology 144 (Pt 10): 2749-2758.

Beitz, E., Becker, D., von Bulow, J., Conrad, C., Fricke, N., Geadkaew, A., Krenc, D., Song, J., Wree, D. and Wu, B. (2009). "In vitro analysis and modification of aquaporin pore selectivity." Handb Exp Pharmacol: 77-92.

Beitz, E. and Schultz, J. E. (1999). "[Aquaporin--a cellular water channel as a therapeutic target?]." Pharm Unserer Zeit 28: 67-73.

Beitz, E., Wu, B., Holm, L. M., Schultz, J. E. and Zeuthen, T. (2006). "Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons." Proc Natl Acad Sci U S A 103: 269-274.

Beitz, E., Zenner, H. P. and Schultz, J. E. (2003). "Aquaporin-mediated fluid regulation in the inner ear." Cell Mol Neurobiol 23: 315-329.

Benito, B., Garciadeblas, B., Schreier, P. and Rodriguez-Navarro, A. (2004). "Novel p-type ATPases mediate high-affinity potassium or sodium uptake in fungi." Eukaryot Cell 3: 359-368.

Bhatta, H. and Goldys, E. M. (2008). "Characterization of yeast strains by fluorescence lifetime imaging microscopy." FEMS Yeast Res 8: 81-87.

8. Literaturverzeichnis

Bhattacharjee, H., Rosen, B. P. and Mukhopadhyay, R. (2009). "Aquaglyceroporins and metalloid transport: implications in human diseases." Handb Exp Pharmacol: 309-325.

Bihler, H., Slayman, C. L. and Bertl, A. (2002). "Low-affinity potassium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by NSC1, a calcium-blocked non-specific cation channel." Biochim Biophys Acta 1558: 109-118.

Borgnia, M., Nielsen, S., Engel, A. and Agre, P. (1999). "Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels." Annu Rev Biochem 68: 425-458.

Borgnia, M. J. and Agre, P. (2001). "Reconstitution and functional comparison of purified GlpF and AqpZ, the glycerol and water channels from *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A 98: 2888-2893.

Borok, Z. and Verkman, A. S. (2002). "Lung edema clearance: 20 years of progress: invited review: role of aquaporin water channels in fluid transport in lung and airways." J Appl Physiol 93: 2199-2206.

Boury-Jamot, M., Daraspe, J., Bonte, F., Perrier, E., Schnebert, S., Dumas, M. and Verbavatz, J. M. (2009). "Skin aquaporins: function in hydration, wound healing, and skin epidermis homeostasis." Handb Exp Pharmacol: 205-217.

Braun, T., Philippse, A., Wirtz, S., Borgnia, M. J., Agre, P., Kuhlbrandt, W., Engel, A. and Stahlberg, H. (2000). "The 3.7 Å projection map of the glycerol facilitator GlpF: a variant of the aquaporin tetramer." EMBO Rep 1: 183-189.

Brejc, K., Sixma, T. K., Kitts, P. A., Kain, S. R., Tsien, R. Y., Ormo, M. and Remington, S. J. (1997). "Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein." Proc Natl Acad Sci U S A 94: 2306-2311.

Burykin, A. and Warshel, A. (2003). "What really prevents proton transport through aquaporin? Charge self-energy versus proton wire proposals." Biophys J 85: 3696-3706.

Carbrey, J. M. and Agre, P. (2009). "Discovery of the aquaporins and development of the field." Handb Exp Pharmacol: 3-28.

Chakrabarti, N., Roux, B. and Pomes, R. (2004). "Structural determinants of proton blockage in aquaporins." J Mol Biol 343: 493-510.

Chaney, L. K. and Jacobson, B. S. (1983). "Coating cells with colloidal silica for high yield isolation of plasma membrane sheets and identification of transmembrane proteins." J Biol Chem 258: 10062-10072.

Chen, H., Ilan, B., Wu, Y., Zhu, F., Schulten, K. and Voth, G. A. (2007a). "Charge delocalization in proton channels, I: the aquaporin channels and proton blockage." Biophys J 92: 46-60.

- Chen, H., Wu, Y. and Voth, G. A. (2006). "Origins of proton transport behavior from selectivity domain mutations of the aquaporin-1 channel." Biophys J 90: L73-75.
- Chen, H., Wu, Y. and Voth, G. A. (2007b). "Proton transport behavior through the influenza A M2 channel: insights from molecular simulation." Biophys J 93: 3470-3479.
- Chepelinsky, A. B. (2009). "Structural function of MIP/aquaporin 0 in the eye lens; genetic defects lead to congenital inherited cataracts." Handb Exp Pharmacol: 265-297.
- Cherny, V. V., Murphy, R., Sokolov, V., Levis, R. A. and DeCoursey, T. E. (2003). "Properties of single voltage-gated proton channels in human eosinophils estimated by noise analysis and by direct measurement." J Gen Physiol 121: 615-628.
- Chung, C. T., Niemela, S. L. and Miller, R. H. (1989). "One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution." Proc Natl Acad Sci U S A 86: 2172-2175.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. and Hsu, L. (1972). "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA." Proc Natl Acad Sci U S A 69: 2110-2114.
- de Groot, B. L., Frigato, T., Helms, V. and Grubmuller, H. (2003). "The mechanism of proton exclusion in the aquaporin-1 water channel." J Mol Biol 333: 279-293.
- de Groot, B. L. and Grubmuller, H. (2001). "Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF." Science 294: 2353-2357.
- DeCoursey, T. E. (2003). "Voltage-gated proton channels and other proton transfer pathways." Physiol Rev 83: 475-579.
- DeCoursey, T. E. (2008). "Voltage-gated proton channels: what's next?" J Physiol 586: 5305-5324.
- DeCoursey, T. E. and Cherny, V. V. (1997). "Deuterium isotope effects on permeation and gating of proton channels in rat alveolar epithelium." J Gen Physiol 109: 415-434.
- Delporte, C. (2009). "Aquaporins in secretory glands and their role in Sjogren's syndrome." Handb Exp Pharmacol: 185-201.
- Denker, B. M., Smith, B. L., Kuhajda, F. P. and Agre, P. (1988). "Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules." J Biol Chem 263: 15634-15642.
- Detmers, F. J., de Groot, B. L., Muller, E. M., Hinton, A., Konings, I. B., Sze, M., Flitsch, S. L., Grubmuller, H. and Deen, P. M. (2006). "Quaternary ammonium compounds as water channel blockers. Specificity, potency, and site of action." J Biol Chem 281: 14207-14214.

8. Literaturverzeichnis

- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T. and MacKinnon, R. (1998). "The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity." Science 280: 69-77.
- Drew, D., Newstead, S., Sonoda, Y., Kim, H., von Heijne, G. and Iwata, S. (2008). "GFP-based optimization scheme for the overexpression and purification of eukaryotic membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*." Nat Protoc 3: 784-798.
- Dutzler, R., Campbell, E. B., Cadene, M., Chait, B. T. and MacKinnon, R. (2002). "X-ray structure of a CIC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity." Nature 415: 287-294.
- Engel, A., Fujiyoshi, Y. and Agre, P. (2000). "The importance of aquaporin water channel protein structures." EMBO J 19: 800-806.
- Engel, A., Fujiyoshi, Y., Gonen, T. and Walz, T. (2008). "Junction-forming aquaporins." Curr Opin Struct Biol 18: 229-235.
- Engel, A. and Stahlberg, H. (2002). "Aquaglyceroporins: channel proteins with a conserved core, multiple functions, and variable surfaces." Int Rev Cytol 215: 75-104.
- Fischbarg, J., Kuang, K. Y., Vera, J. C., Arant, S., Silverstein, S. C., Loike, J. and Rosen, O. M. (1990). "Glucose transporters serve as water channels." Proc Natl Acad Sci U S A 87: 3244-3247.
- Forsyth, W. R., Antosiewicz, J. M. and Robertson, A. D. (2002). "Empirical relationships between protein structure and carboxyl pKa values in proteins." Proteins 48: 388-403.
- Fu, D., Libson, A., Miercke, L. J., Weitzman, C., Nollert, P., Krucinski, J. and Stroud, R. M. (2000). "Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity." Science 290: 481-486.
- Gao, D., Knight, M. R., Trewavas, A. J., Sattelmacher, B. and Plieth, C. (2004). "Self-reporting *Arabidopsis* expressing pH and [Ca²⁺] indicators unveil ion dynamics in the cytoplasm and in the apoplast under abiotic stress." Plant Physiol 134: 898-908.
- Gao, J., Yu, H., Song, Q. and Li, X. (2005). "Establishment of HEK293 cell line expressing green fluorescent protein-aquaporin-1 to determine osmotic water permeability." Anal Biochem 342: 53-58.
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willem, A. R. and Woods, R. A. (1995). "Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure." Yeast 11: 355-360.
- Gleave, A. P. (1992). "A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome." Plant Mol Biol 20: 1203-1207.

- Gonen, T., Cheng, Y., Sliz, P., Hiroaki, Y., Fujiyoshi, Y., Harrison, S. C. and Walz, T. (2005). "Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals." Nature 438: 633-638.
- Gonen, T. and Walz, T. (2006). "The structure of aquaporins." Q Rev Biophys 39: 361-396.
- Gouaux, E. and Mackinnon, R. (2005). "Principles of selective ion transport in channels and pumps." Science 310: 1461-1465.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. and Nairn, R. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol 36: 59-74.
- Gross, P., Marczewski, T. and Herbrig, K. (2009). "The vaptans ante portas: a status report." Nephrol Dial Transplant 24: 1371-1373.
- Hamann, S., Zeuthen, T., La Cour, M., Nagelhus, E. A., Ottersen, O. P., Agre, P. and Nielsen, S. (1998). "Aquaporins in complex tissues: distribution of aquaporins 1-5 in human and rat eye." Am J Physiol 274: C1332-1345.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." J Mol Biol 166: 557-580.
- Hansen, M., Kun, J. F., Schultz, J. E. and Beitz, E. (2002). "A single, bi-functional aquaglyceroporin in blood-stage Plasmodium falciparum malaria parasites." J Biol Chem 277: 4874-4882.
- Hill, W. G., Southern, N. M., MacIver, B., Potter, E., Apodaca, G., Smith, C. P. and Zeidel, M. L. (2005). "Isolation and characterization of the Xenopus oocyte plasma membrane: a new method for studying activity of water and solute transporters." Am J Physiol Renal Physiol 289: F217-224.
- Hille, B., Armstrong, C. M. and MacKinnon, R. (1999). "Ion channels: from idea to reality." Nat Med 5: 1105-1109.
- Ho, J. D., Yeh, R., Sandstrom, A., Chorny, I., Harries, W. E., Robbins, R. A., Miercke, L. J. and Stroud, R. M. (2009). "Crystal structure of human aquaporin 4 at 1.8 Å and its mechanism of conductance." Proc Natl Acad Sci U S A 106: 7437-7442.
- Hoque, A. T., Liu, X., Kagami, H., Swaim, W. D., Wellner, R. B., O'Connell, B. C., Ambudkar, I. S. and Baum, B. J. (2000). "Construction and function of a recombinant adenovirus encoding a human aquaporin 1-green fluorescent protein fusion product." Cancer Gene Ther 7: 476-485.
- Ikeda, M., Beitz, E., Kozono, D., Guggino, W. B., Agre, P. and Yasui, M. (2002). "Characterization of aquaporin-6 as a nitrate channel in mammalian cells. Requirement of pore-lining residue threonine 63." J Biol Chem 277: 39873-39879.
- Ilan, B., Tajkhorshid, E., Schulten, K. and Voth, G. A. (2004). "The mechanism of proton exclusion in aquaporin channels." Proteins 55: 223-228.

8. Literaturverzeichnis

- Ishibashi, K. (2006). "Aquaporin superfamily with unusual npa boxes: S-aquaporins (superfamily, sip-like and subcellular-aquaporins)." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 52: 20-27.
- Ishibashi, K. (2009). "New members of mammalian aquaporins: AQP10-AQP12." Handb Exp Pharmacol: 251-262.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983). "Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations." J Bacteriol 153: 163-168.
- Jensen, M. O., Rothlisberger, U. and Rovira, C. (2005). "Hydroxide and proton migration in aquaporins." Biophys J 89: 1744-1759.
- Jung, J. S., Bhat, R. V., Preston, G. M., Guggino, W. B., Baraban, J. M. and Agre, P. (1994a). "Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance." Proc Natl Acad Sci U S A 91: 13052-13056.
- Jung, J. S., Preston, G. M., Smith, B. L., Guggino, W. B. and Agre, P. (1994b). "Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model." J Biol Chem 269: 14648-14654.
- Kamsteeg, E. J., Bichet, D. G., Konings, I. B., Nivet, H., Lonergan, M., Arthus, M. F., van Os, C. H. and Deen, P. M. (2003). "Reversed polarized delivery of an aquaporin-2 mutant causes dominant nephrogenic diabetes insipidus." J Cell Biol 163: 1099-1109.
- Kamsteeg, E. J. and Deen, P. M. (2001). "Detection of aquaporin-2 in the plasma membranes of oocytes: a novel isolation method with improved yield and purity." Biochem Biophys Res Commun 282: 683-690.
- Kato, M., Pisliakov, A. V. and Warshel, A. (2006). "The barrier for proton transport in aquaporins as a challenge for electrostatic models: the role of protein relaxation in mutational calculations." Proteins 64: 829-844.
- Khademi, S., O'Connell, J., 3rd, Remis, J., Robles-Colmenares, Y., Miercke, L. J. and Stroud, R. M. (2004). "Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å." Science 305: 1587-1594.
- King, L. S., Choi, M., Fernandez, P. C., Cartron, J. P. and Agre, P. (2001). "Defective urinary-concentrating ability due to a complete deficiency of aquaporin-1." N Engl J Med 345: 175-179.
- King, L. S., Kozono, D. and Agre, P. (2004). "From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology." Nat Rev Mol Cell Biol 5: 687-698.
- Knight, A. W., Goddard, N. J., Billinton, N., Cahill, P. A. and Walmsley, R. M. (2002). "Fluorescence polarization discriminates green fluorescent protein from interfering autofluorescence in a microplate assay for genotoxicity." J Biochem Biophys Methods 51: 165-177.

- Ko, Y. J., Huh, J. and Jo, W. H. (2008). "Ion exclusion mechanism in aquaporin at an atomistic level." Proteins 70: 1442-1450.
- Kozono, D., Yasui, M., King, L. S. and Agre, P. (2002). "Aquaporin water channels: atomic structure molecular dynamics meet clinical medicine." J Clin Invest 109: 1395-1399.
- Kruse, E., Uehlein, N. and Kaldenhoff, R. (2006). "The aquaporins." Genome Biol 7: 206.
- Kwon, T. H., Nielsen, J., Moller, H. B., Fenton, R. A., Nielsen, S. and Frokiaer, J. (2009). "Aquaporins in the kidney." Handb Exp Pharmacol: 95-132.
- Leduc-Nadeau, A., Lahjouji, K., Bissonnette, P., Lapointe, J. Y. and Bichet, D. G. (2007). "Elaboration of a novel technique for purification of plasma membranes from *Xenopus laevis* oocytes." Am J Physiol Cell Physiol 292: C1132-1136.
- Lee, J. K., Kozono, D., Remis, J., Kitagawa, Y., Agre, P. and Stroud, R. M. (2005). "Structural basis for conductance by the archaeal aquaporin AqpM at 1.68 Å." Proc Natl Acad Sci U S A 102: 18932-18937.
- Lin, T. I. and Schroeder, C. (2001). "Definitive assignment of proton selectivity and attoampere unitary current to the M2 ion channel protein of influenza A virus." J Virol 75: 3647-3656.
- Lippincott-Schwartz, J., Snapp, E. and Kenworthy, A. (2001). "Studying protein dynamics in living cells." Nat Rev Mol Cell Biol 2: 444-456.
- Liu, H. S., Jan, M. S., Chou, C. K., Chen, P. H. and Ke, N. J. (1999). "Is green fluorescent protein toxic to the living cells?" Biochem Biophys Res Commun 260: 712-717.
- Loonen, A. J., Knoers, N. V., van Os, C. H. and Deen, P. M. (2008). "Aquaporin 2 mutations in nephrogenic diabetes insipidus." Semin Nephrol 28: 252-265.
- Lorenzen, I., Aberle, T. and Plieth, C. (2004). "Salt stress-induced chloride flux: a study using transgenic *Arabidopsis* expressing a fluorescent anion probe." Plant J 38: 539-544.
- Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, W. F., Prior, B. A., Ramos, J., Thevelein, J. M. and Hohmann, S. (1995). "Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress." EMBO J 14: 1360-1371.
- Ma, T., Yang, B., Gillespie, A., Carlson, E. J., Epstein, C. J. and Verkman, A. S. (1998). "Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels." J Biol Chem 273: 4296-4299.
- Macey, R. I. (1984). "Transport of water and urea in red blood cells." Am J Physiol 246: C195-203.

8. Literaturverzeichnis

- Maeda, N., Hibuse, T. and Funahashi, T. (2009). "Role of aquaporin-7 and aquaporin-9 in glycerol metabolism; involvement in obesity." Handb Exp Pharmacol: 233-249.
- Maresova, L. and Sychrova, H. (2005). "Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae kha1* deletion mutants." Mol Microbiol 55: 588-600.
- Marini, A. M., Vissers, S., Urrestarazu, A. and Andre, B. (1994). "Cloning and expression of the *MEP1* gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*." EMBO J 13: 3456-3463.
- Martinez-Munoz, G. A. and Kane, P. (2008). "Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast." J Biol Chem 283: 20309-20319.
- Mathai, J. C., Mori, S., Smith, B. L., Preston, G. M., Mohandas, N., Collins, M., van Zijl, P. C., Zeidel, M. L. and Agre, P. (1996). "Functional analysis of aquaporin-1 deficient red cells. The Colton-null phenotype." J Biol Chem 271: 1309-1313.
- Maurel, C., Reizer, J., Schroeder, J. I., Chrispeels, M. J. and Saier, M. H., Jr. (1994). "Functional characterization of the *Escherichia coli* glycerol facilitator, GlpF, in *Xenopus oocytes*." J Biol Chem 269: 11869-11872.
- Miesenbock, G., De Angelis, D. A. and Rothman, J. E. (1998). "Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins." Nature 394: 192-195.
- Misawa, T., Arima, K., Mizusawa, H. and Satoh, J. (2008). "Close association of water channel AQP1 with amyloid-beta deposition in Alzheimer disease brains." Acta Neuropathol 116: 247-260.
- Mitchell, P. (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism." Nature 191: 144-148.
- Morais-Cabral, J. H., Zhou, Y. and MacKinnon, R. (2001). "Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter." Nature 414: 37-42.
- Morishita, Y., Matsuzaki, T., Hara-chikuma, M., Andoo, A., Shimono, M., Matsuki, A., Kobayashi, K., Ikeda, M., Yamamoto, T., Verkman, A., Kusano, E., Ookawara, S., Takata, K., Sasaki, S. and Ishibashi, K. (2005). "Disruption of aquaporin-11 produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule." Mol Cell Biol 25: 7770-7779.
- Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J. B., Engel, A. and Fujiyoshi, Y. (2000). "Structural determinants of water permeation through aquaporin-1." Nature 407: 599-605.
- Newby, Z. E., O'Connell, J., 3rd, Robles-Colmenares, Y., Khademi, S., Miercke, L. J. and Stroud, R. M. (2008). "Crystal structure of the aquaglyceroporin PfAQP from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*." Nat Struct Mol Biol 15: 619-625.

Nielsen, S., Chou, C. L., Marples, D., Christensen, E. I., Kishore, B. K. and Knepper, M. A. (1995). "Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane." Proc Natl Acad Sci U S A 92: 1013-1017.

Nielsen, S., Kwon, T. H., Frokiaer, J. and Agre, P. (2007). "Regulation and dysregulation of aquaporins in water balance disorders." J Intern Med 261: 53-64.

Nielsen, S., Marples, D., Frokiaer, J., Knepper, M. and Agre, P. (1996). "The aquaporin family of water channels in kidney: an update on physiology and pathophysiology of aquaporin-2." Kidney Int 49: 1718-1723.

Noskov, S. Y. and Roux, B. (2006). "Ion selectivity in potassium channels." Biophys Chem 124: 279-291.

Oghlakian, G. and Klapholz, M. (2009). "Vasopressin and vasopressin receptor antagonists in heart failure." Cardiol Rev 17: 10-15.

Orij, R., Postmus, J., Ter Beek, A., Brul, S. and Smits, G. J. (2009). "In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth." Microbiology 155: 268-278.

Pao, G. M., Wu, L. F., Johnson, K. D., Hofte, H., Chrispeels, M. J., Sweet, G., Sandal, N. N. and Saier, M. H., Jr. (1991). "Evolution of the MIP family of integral membrane transport proteins." Mol Microbiol 5: 33-37.

Park, J. H. and Saier, M. H., Jr. (1996). "Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins." J Membr Biol 153: 171-180.

Phongphanphanee, S., Yoshida, N. and Hirata, F. (2008). "On the proton exclusion of aquaporins: a statistical mechanics study." J Am Chem Soc 130: 1540-1541.

Pohl, P. (2004). "Combined transport of water and ions through membrane channels." Biol Chem 385: 921-926.

Pomes, R. and Roux, B. (1996). "Structure and dynamics of a proton wire: a theoretical study of H⁺ translocation along the single-file water chain in the gramicidin A channel." Biophys J 71: 19-39.

Pomes, R. and Roux, B. (2002). "Molecular mechanism of H⁺ conduction in the single-file water chain of the gramicidin channel." Biophys J 82: 2304-2316.

Portella, G., Pohl, P. and de Groot, B. L. (2007). "Invariance of single-file water mobility in gramicidin-like peptidic pores as function of pore length." Biophys J 92: 3930-3937.

Preston, G. M., Carroll, T. P., Guggino, W. B. and Agre, P. (1992). "Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein." Science 256: 385-387.

8. Literaturverzeichnis

- Preston, G. M., Jung, J. S., Guggino, W. B. and Agre, P. (1993). "The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel." J Biol Chem 268: 17-20.
- Preston, G. M., Jung, J. S., Guggino, W. B. and Agre, P. (1994). "Membrane topology of aquaporin CHIP. Analysis of functional epitope-scanning mutants by vectorial proteolysis." J Biol Chem 269: 1668-1673.
- Reizer, J., Reizer, A. and Saier, M. H., Jr. (1993). "The MIP family of integral membrane channel proteins: sequence comparisons, evolutionary relationships, reconstructed pathway of evolution, and proposed functional differentiation of the two repeated halves of the proteins." Crit Rev Biochem Mol Biol 28: 235-257.
- Ren, G., Reddy, V. S., Cheng, A., Melnyk, P. and Mitra, A. K. (2001). "Visualization of a water-selective pore by electron crystallography in vitreous ice." Proc Natl Acad Sci U S A 98: 1398-1403.
- Rodriguez-Navarro, A. and Ramos, J. (1984). "Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*." J Bacteriol 159: 940-945.
- Roux, B. and MacKinnon, R. (1999). "The cavity and pore helices in the KcsA K⁺ channel: electrostatic stabilization of monovalent cations." Science 285: 100-102.
- Savage, D. F., Egea, P. F., Robles-Colmenares, Y., O'Connell, J. D., 3rd and Stroud, R. M. (2003). "Architecture and selectivity in aquaporins: 2.5 a X-ray structure of aquaporin Z." PLoS Biol 1: E72.
- Schnermann, J., Chou, C. L., Ma, T., Traynor, T., Knepper, M. A. and Verkman, A. S. (1998). "Defective proximal tubular fluid reabsorption in transgenic aquaporin-1 null mice." Proc Natl Acad Sci U S A 95: 9660-9664.
- Schulte, A., Lorenzen, I., Bottcher, M. and Plieth, C. (2006). "A novel fluorescent pH probe for expression in plants." Plant Methods 2: 7.
- Shi, N., Ye, S., Alam, A., Chen, L. and Jiang, Y. (2006). "Atomic structure of a Na⁺- and K⁺-conducting channel." Nature 440: 570-574.
- Shimomura, O., Johnson, F. H. and Saiga, Y. (1962). "Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*." J Cell Comp Physiol 59: 223-239.
- Sidel, V. W. and Solomon, A. K. (1957). "Entrance of water into human red cells under an osmotic pressure gradient." J Gen Physiol 41: 243-257.
- Smith, B. L. and Agre, P. (1991). "Erythrocyte Mr 28,000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins." J Biol Chem 266: 6407-6415.
- Sogaard, R., Alsterfjord, M., Macaulay, N. and Zeuthen, T. (2009). "Ammonium ion transport by the AMT/Rh homolog TaAMT1;1 is stimulated by acidic pH." Pflugers Arch 458: 733-743.

Sohara, E., Uchida, S. and Sasaki, S. (2009). "Function of aquaporin-7 in the kidney and the male reproductive system." Handb Exp Pharmacol: 219-231.

Song, Y., Jayaraman, S., Yang, B., Matthay, M. A. and Verkman, A. S. (2001). "Role of aquaporin water channels in airway fluid transport, humidification, and surface liquid hydration." J Gen Physiol 117: 573-582.

Stouffer, A. L., Acharya, R., Salom, D., Levine, A. S., Di Costanzo, L., Soto, C. S., Tereshko, V., Nanda, V., Stayrook, S. and DeGrado, W. F. (2008). "Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel." Nature 451: 596-599.

Stroud, R. M., Savage, D., Miercke, L. J., Lee, J. K., Khademi, S. and Harries, W. (2003). "Selectivity and conductance among the glycerol and water conducting aquaporin family of channels." FEBS Lett 555: 79-84.

Sui, H., Han, B. G., Lee, J. K., Walian, P. and Jap, B. K. (2001). "Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel." Nature 414: 872-878.

Takahashi, A., Zhang, Y., Centonze, E. and Herman, B. (2001). "Measurement of mitochondrial pH in situ." Biotechniques 30: 804-808, 810, 812 passim.

Takeda, T. and Taguchi, D. (2009). "Aquaporins as potential drug targets for Meniere's disease and its related diseases." Handb Exp Pharmacol: 171-184.

Takeuchi, Y., Dotson, M. and Keen, N. T. (1992). "Plant transformation: a simple particle bombardment device based on flowing helium." Plant Mol Biol 18: 835-839.

Trudeau, M. C., Warmke, J. W., Ganetzky, B. and Robertson, G. A. (1995). "HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family." Science 269: 92-95.

Tsunoda, S. P., Wiesner, B., Lorenz, D., Rosenthal, W. and Pohl, P. (2004). "Aquaporin-1, nothing but a water channel." J Biol Chem 279: 11364-11367.

Unger, V. M. (2000). "Fraternal twins: AQP1 and GlpF." Nat Struct Biol 7: 1082-1084.

van der Rest, M. E., Kamminga, A. H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B. and Konings, W. N. (1995). "The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis." Microbiol Rev 59: 304-322.

van Hoek, A. N. and Verkman, A. S. (1992). "Functional reconstitution of the isolated erythrocyte water channel CHIP28." J Biol Chem 267: 18267-18269.

van Hoek, A. N., Wiener, M. C., Verbavatz, J. M., Brown, D., Lipniunas, P. H., Townsend, R. R. and Verkman, A. S. (1995). "Purification and structure-function analysis of native, PNGase F-treated, and endo-beta-galactosidase-treated CHIP28 water channels." Biochemistry 34: 2212-2219.

8. Literaturverzeichnis

- Verkman, A. S. (2002). "Aquaporin water channels and endothelial cell function." J Anat 200: 617-627.
- Verkman, A. S. (2009a). "Aquaporins: translating bench research to human disease." J Exp Biol 212: 1707-1715.
- Verkman, A. S. (2009b). "Knock-out models reveal new aquaporin functions." Handb Exp Pharmacol: 359-381.
- Verkman, A. S., Hara-Chikuma, M. and Papadopoulos, M. C. (2008). "Aquaporins--new players in cancer biology." J Mol Med 86: 523-529.
- Wallace, B. A. (1986). "Structure of gramicidin A." Biophys J 49: 295-306.
- Walz, T., Fujiyoshi, Y. and Engel, A. (2009). "The AQP structure and functional implications." Handb Exp Pharmacol: 31-56.
- Walz, T., Smith, B. L., Agre, P. and Engel, A. (1994). "The three-dimensional structure of human erythrocyte aquaporin CHIP." EMBO J 13: 2985-2993.
- Wang, F., Feng, X. C., Li, Y. M., Yang, H. and Ma, T. H. (2006). "Aquaporins as potential drug targets." Acta Pharmacol Sin 27: 395-401.
- Wangerchuk, D. M., Lennon, V. A., Lucchinetti, C. F., Pittock, S. J. and Weinshenker, B. G. (2007). "The spectrum of neuromyelitis optica." Lancet Neurol 6: 805-815.
- Wraight, C. A. (2006). "Chance and design--proton transfer in water, channels and bioenergetic proteins." Biochim Biophys Acta 1757: 886-912.
- Wu, B., Altmann, K., Barzel, I., Krehan, S. and Beitz, E. (2008). "A yeast-based phenotypic screen for aquaporin inhibitors." Pflugers Arch 456: 717-720.
- Wu, B. and Beitz, E. (2007). "Aquaporins with selectivity for unconventional permeants." Cell Mol Life Sci 64: 2413-2421.
- Yasui, M. (2009). "pH regulated anion permeability of aquaporin-6." Handb Exp Pharmacol: 299-308.
- Yasui, M., Hazama, A., Kwon, T. H., Nielsen, S., Guggino, W. B. and Agre, P. (1999). "Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin." Nature 402: 184-187.
- Yasui, M., Serlachius, E., Lofgren, M., Belusa, R., Nielsen, S. and Aperia, A. (1997). "Perinatal changes in expression of aquaporin-4 and other water and ion transporters in rat lung." J Physiol 505 (Pt 1): 3-11.

Zador, Z., Stiver, S., Wang, V. and Manley, G. T. (2009). "Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke." Handb Exp Pharmacol: 159-170.

Zampighi, G. A., Kreman, M., Boorer, K. J., Loo, D. D., Bezanilla, F., Chandy, G., Hall, J. E. and Wright, E. M. (1995). "A method for determining the unitary functional capacity of cloned channels and transporters expressed in *Xenopus laevis* oocytes." J Membr Biol 148: 65-78.

Zardoya, R. (2005). "Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family." Biol Cell 97: 397-414.

Zeidel, M. L., Ambudkar, S. V., Smith, B. L. and Agre, P. (1992). "Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein." Biochemistry 31: 7436-7440.

Zeidel, M. L., Nielsen, S., Smith, B. L., Ambudkar, S. V., Maunsbach, A. B. and Agre, P. (1994). "Ultrastructure, pharmacologic inhibition, and transport selectivity of aquaporin channel-forming integral protein in proteoliposomes." Biochemistry 33: 1606-1615.

Zeuthen, T., Meinild, A. K., Klaerke, D. A., Loo, D. D., Wright, E. M., Belhage, B. and Litman, T. (1997). "Water transport by the Na⁺/glucose cotransporter under isotonic conditions." Biol Cell 89: 307-312.

Zhang, R., van Hoek, A. N., Biwersi, J. and Verkman, A. S. (1993). "A point mutation at cysteine 189 blocks the water permeability of rat kidney water channel CHIP28k." Biochemistry 32: 2938-2941.

Zhang, R. B., Logee, K. A. and Verkman, A. S. (1990). "Expression of mRNA coding for kidney and red cell water channels in *Xenopus* oocytes." J Biol Chem 265: 15375-15378.

Zhang, W., Zitron, E., Homme, M., Kihm, L., Morath, C., Scherer, D., Hegge, S., Thomas, D., Schmitt, C. P., Zeier, M., Katus, H., Karle, C. and Schwenger, V. (2007). "Aquaporin-1 channel function is positively regulated by protein kinase C." J Biol Chem 282: 20933-20940.

Zhou, Y. and MacKinnon, R. (2003). "The occupancy of ions in the K⁺ selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates." J Mol Biol 333: 965-975.

Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A. and MacKinnon, R. (2001). "Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution." Nature 414: 43-48.

8. Literaturverzeichnis

9 Anhang

9.1 Sequenz von AQP1 aus der Ratte

ATGGCCAGCGAAATCAAGAAGAAGCTCTTCTGGAGGGCTGTGGTGGCTGAGTCCTGGCC	60
M A S E I K K L F W R A V V A E F L A	
ATGACCCTTTCGTCTTCATCAGCATCGTTCTGCCCTAGGCTTCAATTACCCACTGGAG	120
M T L F V F I S I G S A L G F N Y P L E	
AGAAACCAGACGCTGGTCCAGGACAATGTGAAGGTGTCACTGGCCTTGGTCTGAGCATC	180
R N Q T L V Q D N V K V S L A F G L S I	
GCTACTCTGGCCCAAAGTGTGGGTACATCAGTGGTGCTCACCTCAACCCAGCGGTACACA	240
A T L A Q S V G H I S G A H L N P A V T	
CTGGGGCTTCTGCTCAGCTGTCAAGATCAGCATCCTCCGGCTGTCATGTATATCATGCC	300
L G L L S C Q I S I L R A V M Y I I A	
CAGTGTGTGGAGCCATCGTTGCCTCCGCCATCCTCTCCGGCATCACCTCCTCCCTGCTC	360
Q C V G A I V A S A I L S G I T S S L L	
GAGAACTCACTGGCCGAAATGACCTGGCTCGAGGTGTGAACCTCCGGCCAGGGCCTGGC	420
E N S L G R N D L A R G V N S G Q G L G	
ATTGAGATCATTGGCACCCCTGCAGCTGGTGCTGTGCGTTCTGGCTACCACTGACCGGAGG	480
I E I I G T L Q L V L C V L A T T D R R	
CGCCGAGACTTAGGTGGCTCAGCCCCACTGCCATTGGCTGTGGCTCTGGACAC	540
R R D L G G S A P L A I G L S V A L G H	
CTGCTGCCATTGACTACACTGGCTGTGGATCAACCCCTGCCCGGTCAATTGGCTCTGCT	600
L L A I D Y T G C G I N P A R S F G S A	
GTGCTACCCGCAACTTCTCAAACCACTGGATTTCTGGTGGACCATTCAATTGGAGT	660
V L T R N F S N H W I F W V G P F I G S	
GCCCTGGCAGTGCTGATCTATGACTTCATCCTGGCCCCACGCAGCAGCAGACTTACAGAC	720
A L A V L I Y D F I L A P R S S D F T D	
CGCATGAAGGTGTGGACCAGTGGCCAAGTGGAGGAGTATGACCTGGATGCTGATGATATC	780
R M K V W T S G Q V E E Y D L D A D D I	
AACTCCAGGGTGGAGATGAAGCCAAA	
N S R V E M K P K	

9.2 Sequenz von ratiometrischem pHluorin

ATGAGTAAAGGAGAAGAACCTTCACTGGAGTTGCCAATTCTGTTGAATTAGATGGT	60
M S K G E E L F T G V V P I L V E L D G	
GATGTTAACGGCACAAATTCTGTCACTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGA	120
D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y G	
AAACTTACCTTAAATTATTGCACACTGGAAAACACCTGTTCCATGCCAACACTT	180
K L T L K F I C T T G K L P V P W P T L	
GTCACTACTTCTTATGGTGTCAATGCTTCAAGATAACCAGATCATATGAAACGG	240
V T T F S Y G V Q C F S R Y P D H M K R	
CATGACTTTCAAGAGTGCCATGCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATTTTC	300
H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I F F	
AAAGATGACGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTGAAGGTGATACCCTGTT	360
K D D G N Y K T R A E V K F E G D T L V	
AATAGAACGAGTAAAGGTATTGATTTAAAGATGATGGAAACATTCTGGACACAAA	420
N R I E L K G I D F K D D G N I L G H K	
TTGGAATACAACATAACGAGCACTTGGTGTACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGT	480
L E Y N Y N E H L V Y I M A D K Q K N G	
ACCAAAGCTATTTCAAGTTCAACCACATTGAAGATGGAGGCCTCAACTAGCAGAC	540
T K A I F Q V H H N I E D G G V Q L A D	
CATTATCAACAAACTCCAATTGGCGATGCCCTGTCCTTTACCAAGACAACCATTAC	600
H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H Y	
CTGCACACACAATCTGCCCTTCGAAAGATCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGCTTT	660
L H T Q S A L S K D P N E K R D H M V F	
CTTGAGTTGTAACAGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACATACAAA	
L E F V T A A G I T H G M D E L Y K	

Erklärung

Diese Abhandlung ist, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer, Prof. Dr. E. Beitz, nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit. Sie hat bisher an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Ein großer Teil der Ergebnisse wurde im EMBO Journal unter dem Titel „Concerted action of two cation filters in the aquaporin water channel“ (Wu, B., Steinbronn, C., Alsterfjord, M., Zeuthen, T. und Beitz, E. (2009) EMBO J 28: 2188-2194) publiziert.

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Kiel, im Oktober 2009

Christina Steinbronn

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Eric Beitz.

Für die aufregende Zeit im neu entstandenen Arbeitskreis danke ich ihm herzlich, ebenso für die Überlassung des interessanten Themas, die Diskussionsbereitschaft und Förderung sowie die allzeit offene Tür.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Zeuthen für die elektrophysiologische Untersuchung meiner Mutanten und an Herrn PD Dr. Plieth für die Hilfe bei den Perfusionsexperimenten und bei der konfokalen Lasermikroskopie.

Bedanken möchte ich mich bei allen Kollegen und Angehörigen des Instituts und meinem Arbeitskreis für das nette Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft.

Doro und Dana sei herzlich gedankt für die schöne Zusammenarbeit in der turbulenten Anfangsphase und Doro für die ruhige Zeit frühmorgens zu zweit im Labor. Danke auch für die netten Treffen außerhalb der Uni. Ein besonderer Dank geht an Julia für die große Hilfe bei den Fröschen und die geduldige Einführung in den Umgang mit den Oozyten und auch an Nadine für die große Unterstützung bei der Zellkultur. Danke an alle Büro-Damen für die netten Päuschen!

Binghua, der bei Klonierungsproblemen und Fragen zu Hefen immer Rat wusste, danke ich für seine hilfreichen Tipps.

Ein besonderes Dankeschön gebührt auch Björn und Susan, nicht zuletzt für die Primersynthesen und Sequenziergele.

Vielen Dank meinen Korrekturlesern Julia und Dawid für die konstruktive Kritik und meinen Eltern und Felix für die akribische Fehlersuche.

Dana, Anja und Uli sei herzlich für die gute Zusammenarbeit bei der Betreuung des vierten Semesters gedankt.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Schwestern und meinen Freunden, besonders Frieda und Iris.

Ein großes Dankeschön gilt meinen Eltern für die Liebe und Hilfe zu jeder Zeit und besonders meinem lieben Mann Felix, der mich großartig unterstützt hat und mich glücklich macht! Danke!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Christina Steinbronn (geb. Conrad)
Geburtsdatum	14. April 1979
Geburtsort	Flensburg

Schulbildung

1986-1990	Grundschule, Harrislee
1990-1999	Altes Gymnasium, Flensburg

Studium

1999-2003	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
12/2003 bis 05/2004	Institut für Pharmazeutische Chemie an der Universität Wien unter der Leitung von Prof. Noe
06/2004 bis 11/2004	Nord-Apotheke, Oldenburg/Holstein
12/2004	Approbation als Apothekerin

Berufstätigkeit

04/2005-09/2006	Apotheke am Alsterdorfer Markt, Hamburg
-----------------	-----------------------------------------

Promotion

10/2006-07/2009	Durchführung des experimentellen Teiles der vorliegenden Arbeit im Arbeitskreis von Prof. Beitz am Institut für Pharmazeutische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
-----------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------